

INSTITUT FÜR TIERPHYSIOLOGIE
UND ANGEWANDTE ZOOLOGIE
FACHBEREICH 23 (BIOLOGIE)

**REGULATION DES KOHLENHYDRAT-UND
LIPIDSTOFFWECHSELS WÄHREND DER
SPÄTEN LARVALENTWICKLUNG UND DES
HUNGERS VON MANDUCA SEXTA**

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR
ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE
AM FACHBEREICH BIOLOGIE
DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN

VORGELEGT VON
KARL SIEGERT
AUS BERLIN-NEUKÖLLN

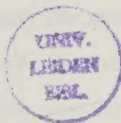
1983

INSTITUT FÜR TIERPHYSIOLOGIE UND ANGEWANDTE ZOOLOGIE
FACHBEREICH 23 (BIOLOGIE)

REGULATION DES KOHLENHYDRAT- UND LIPIDSTOFFWECHSELS WÄHREND DER
SPÄTEN LARVALENTWICKLUNG UND DES HUNGERNS VON MANDUCA SEXTA

INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR
ERLANGUNG DER DOKTORWÜRDE
AM FACHBEREICH BIOLOGIE
DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN

VORGELEGT VON
KARL SIEGERT
AUS BERLIN-NEUKÖLLN
1983



1. Referent : Prof. Dr. R. Ziegler

2. Referent : Prof. Dr. K. Graszynski

Tag der mündlichen Prüfung : 19.4.1983

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung und Fragestellung	7
2. Abkürzungen	10
3. Material und Methoden	12
3.1. Tierhaltung	12
3.2. Präparation der Versuchstiere und Aufarbeitung von Hämolymphe, Fettkörper und Kutikula	14
3.2.1. Aufarbeitung von Hämolympheproben	14
3.2.1.1. Aufarbeitung der Hämolymphe für die Zuckerbestimmungen	14
3.2.1.2. Aufarbeitung der Hämolymphe für die Lipidbestimmung	15
3.2.1.3. Aufarbeitung der Hämolymphe für die Proteinbestimmung	15
3.2.2. Aufarbeitung von Fettkörperproben	15
3.2.2.1. Aufarbeitung von Fettkörperproben für die Glykogenbestimmung	16
3.2.2.2. Aufarbeitung von Fettkörperproben für die Lipidbestimmung	16
3.2.2.3. Aufarbeitung von Fettkörperproben für die Proteinbestimmung	17
3.2.2.4. Aufarbeitung von Fettkörperproben für die DNA-Bestimmung	17
3.2.2.5. Aufarbeitung von Fettkörperproben für die Messung der Glykogenphosphorylaseaktivität	18
3.2.2.6. Aufarbeitung von Fettkörperproben zur Extraktion der intrazellulären Zucker	18
3.2.3. Aufarbeitung der Kutikula zur Chitosanbestimmung	19
3.3. Quantitative Bestimmungen	19

	Seite
3.3.1. Enzymatische Glucose- und Fructosebestimmung	19
3.3.2. Zuckerbestimmung mit Anthronreagens	20
3.3.3. Lipidbestimmung mit dem Sulphophosphovanillinreagens	20
3.3.4. DNA-Bestimmung mit dem Diphenyl-Eisessig-Reagens	20
3.3.5. Messung der Glykogenphosphorylaseaktivitäten	21
3.3.6. Proteinbestimmung	21
3.3.7. Bestimmung des Hämolympfvolumens	22
3.3.8. Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs und der Kohlendioxid- produktion mit Hilfe der Warburg-Manometrie	22
3.4. Injektionen	24
3.4.1. Injektionen von Corpus cardiacum-Corpus allatum-Extrakten	24
3.4.2. Injektionen von Glucose- und Trehaloselösungen	24
3.4.3. Injektionen von Tetrodotoxin	24
3.5. Entnahme der Corpora cardiaca und Corpora allata	25
4. Ergebnisse	26
4.1. Veränderungen im Stoffwechsel von <i>Manduca sexta</i> während der späten Larvalentwicklung	26
4.1.1. Veränderungen des Körpergewichts, des Hämolympfvolumens und des Fettkörpertrockengewichts	26
4.1.2. Veränderungen der Proteinmengen in Hämolymphe und Fett- körper	29
4.1.3. DNA-Gehalt des Fettkörpers	31
4.1.4. Aktivitäten der Fettkörperglykogenphosphorylase	31
4.1.5. Kohlenhydratgehalt in Fettkörper, Hämolymphe und Kutikula	35
4.1.6. Lipidgehalt in Hämolymphe und Fettkörper	40
4.1.7. Sauerstoffverbrauch, Kohlendioxidproduktion und Respira- torische Quotienten	43
4.2. Untersuchungen an hungernden Larven von <i>Manduca sexta</i>	47

	Seite
4.2.1. Veränderungen des Körpergewichts, des Hämolympfvolumens und des Fettkörper Trockengewichts	47
4.2.2. Veränderungen der Proteinmengen in Hämolymphe und Fettkörper	50
4.2.3. Aktivitäten der Fettkörperglykogenphosphorylase	52
4.2.4. Kohlenhydratmengen in Fettkörper, Hämolymphe und Kutikula	55
4.2.5. Lipidmengen in Hämolymphe und Fettkörper	62
4.2.6. Sauerstoffverbrauch, Kohlendioxidproduktion und Respiratorische Quotienten	64
4.3. Untersuchungen zur Steuerung der Phosphorylaseaktivierung in hungernden Larven von <i>Manduca sexta</i>	70
4.3.1. Tetrodotoxin-Paralyse von hungernden Larven	70
4.3.2. Verfütterung von Agar	70
4.3.3. Wirkung von Extrakten der CcCa in unbehandelten Larven des 3. Tages vom 5. Larvenstadium	73
4.3.4. Auswirkung der Entfernung der Corpora cardiaca und Corpora allata auf die Aktivierung der Fettkörperglykogenphosphorylase in hungernden Larven	74
4.3.5. Wirkung larvaler Corpora cardiaca und Corpora allata in cardiacectomierten, allatectomierten Larven	76
4.3.6. Gesamtzuckerkonzentrationen der Hämolymphe in cardiacectomierten, allatectomierten Larven nach 3 h Hunger	77
4.3.7. Aktivierung der Fettkörperglykogenphosphorylase durch Extrakte der CcCa in Larven, die 24 und 48 h gehungert worden waren	77
4.3.8. Injektion von Glucose und Trehalose in hungernde Larven	80
4.3.9. Wirkung von Extrakten der CcCa in mit Glucose behandelten Hungertieren	84
4.3.10. Verfütterung von Agar (3 %), das 3,2 % Saccharose enthielt	84

	Seite
4.3.11. Verfütterung von Agar (3 %), das verschiedene Kohlenhydrate (3.2 %) enthält	87
4.3.12. Auswirkung der Injektion von 6-Deoxy-D-Glucose auf die Aktivierung der Fettkörperglykogenphosphorylase in hungrigen Larven von <i>Manduca sexta</i>	90
4.4. Auswirkung der Entnahme von Cc und Ca auf die innerhalb der späten Larvalentwicklung auftretenden Aktivierungen der Fettkörperglykogenphosphorylase	92
4.4.1. Häutung vom 4. zum 5. Larvenstadium	92
4.4.2. Wandernde Larven	92
5. Diskussion	95
5.1. Die späte Larvalentwicklung von <i>Manduca sexta</i>	95
5.2. Steuerung des Stoffwechsels in hungrigen Larven des 5. Stadiums von <i>Manduca sexta</i>	121
5.3. Vergleich von Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel in hungrigen Insekten und Säugetieren	137
6. Zusammenfassung	143
7. Literaturverzeichnis	146
8. Danksagung	159
9. Lebenslauf	160

1. Einleitung und Fragestellung

Während der postembryonalen Entwicklung von Insekten werden - wie bei allen anderen Tieren - Kohlenhydrate, Lipide und Proteine auf die verschiedenste Art und Weise im Stoffwechsel gebraucht und umgesetzt. Diese Substanzen werden als Bausteine des wachsenden und sich entwickelnden Organismus gebraucht und vor allem Kohlenhydrate und Lipide zur Energiegewinnung für alle Lebensprozesse und besondere Stoffwechselleistungen, wie z.B. Flug, benötigt (BEENAKKERS, VAN DER HORST und VAN MARREWIJK, 1981; STEELE, 1981). Aus Kohlenhydraten werden aber auch Substanzen wie Glycerin und andere Polyole hergestellt, die in verschiedenen Stadien und Arten der Insekten dazu beitragen, Kälteperioden ohne Schaden zu überstehen (STEELE, 1981). Ein Zusammenhang zwischen Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel besteht jedoch auch, da Glucose in Lipide umgewandelt werden kann, wenn ein Überangebot an Glucose vorliegt (KALLAPUR, DOWNER und GEORGE, 1980; CHIPPENDALE, 1978).

Während der Larvalentwicklung der Insekten werden vor allem große Reserven an Kohlenhydraten (als Glykogen) und Lipiden (als Triacylglycerine) angelegt; diese werden in anderen Stadien und wenn die Tiere keine Nahrung aufnehmen können, wieder verbraucht. Solche Lebensabschnitte können von kurzer (z.B. Häutungen) oder langer Dauer sein (z.B. Puppenzeit oder Diapause). Die größten Reserven werden im Fettkörper aufgebaut. Dieses Organ der Insekten vereinigt die Funktionen von Leber und Fettgewebe der Säuger (WYATT, 1975). Einerseits ist der Fettkörper für die Lagerung von Kohlenhydraten, Lipiden und Proteinen verantwortlich, andererseits ist er das Zentralorgan des Stoffwechsels dieser und anderer Substanzen (KILBY, 1963; WYATT, 1975). Die Hämolymphe umspült den Fettkörper und hat direkten Kontakt zu allen Zellen; sie ist für den Transport zwischen den Organen verantwortlich. Die Transportform der Kohlenhydrate ist hauptsächlich das nicht reduzierende Disaccharid Trehalose, dagegen macht Glucose nur wenige Prozente der Hämolymphezuckermenge aus (WYATT, 1967). Lipide werden vorwiegend als Diacylglycerine (CHINO und

GILBERT,1965) an Proteine gebunden transportiert (DOWNER,1978).

Sowohl die Mengen der Kohlenhydrate,Lipide und Proteine im Fettkörper als auch die Konzentrationen dieser Substanzen in der Hämolymphe hängen innerhalb einer Art von Entwicklungsstatus und Ernährungszustand der Tiere zum Zeitpunkt der Probenentnahme ab.Während der letzten 20 Jahre sind Hormone nachgewiesen worden,die den Stoffwechsel dieser drei Substanzklassen beeinflussen;die Hormone sind vor allem in den Corpora cardiaca (Cc) oder Corpora allata (Ca) der Insekten zu finden.STEELE (1961) wies einen Faktor in den Cc der Schabe *Periplaneta americana* nach,der den Trehalosespiegel der Hämolymphe erhöht und als Hyperglykämischer Faktor bezeichnet wurde.Dieses Peptid (MIGLIORI NATALIZI und FRONTALI,1966;MIGLIORI NATALIZI,PANSA,D'AJELLO,CASAGLIA,BETTINI und FRONTALI,1970),dessen Struktur noch nicht aufgeklärt worden ist,wirkt auf den Fettkörper und aktiviert die Glykogenphosphorylase, das Schrittmacherenzym des Glykogenabbaus (STEELE,1963).STEELE (1976) stellte fest,daß die physiologische Rolle des Hyperglykämischen Faktors ungewiß ist;bis heute hat sich an dieser Tatsache nichts grundlegendes geändert.MAYER und CANDY (1969) und BEENAKKERS (1969) konnten in den Cc von *Schistocerca gregaria* bzw. *Locusta migratoria* eine Substanz nachweisen,die die Freisetzung von Diacylglycerinen aus dem Fettkörper hervorruft;MAYER und CANDY (1969) bezeichneten diese Substanz als Adipokinetisches Hormon (AKH).Die Aminosäuresequenz dieses Peptids wurde von STONE,MORDUE,BATLEY und MORRIS (1976) aufgeklärt;AKH kontrolliert die Lipidfreisetzung aus dem Fettkörper (MAYER und CANDY,1969) und den Lipidverbrauch in den Flugmuskeln (ROBINSON und GOLDSWORTHY,1974) während des Fluges von Heuschrecken.Das Juvenilhormon der Ca stimuliert die Vitellogeninsynthese im Fettkörper vieler Tiere;diese Funktion kann jedoch auch in manchen Insekten vom Ecdysteron der Prothoraxdrüsen übernommen werden (WYATT,1980).

In den Cc von *Manduca sexta* konnte ebenfalls ein Peptid nachgewiesen werden,das in Larven die Fettkörperglykogenphosphorylase aktiviert (ZIEGLER, 1979). In der vorliegenden Untersuchung sollte deshalb bei *Manduca sexta* un-

tersucht werden, ob und welche Veränderungen in den Aktivitäten der Fettkörperglykogenphosphorylase während der späten Larvalentwicklung auftreten. Um Hinweise über die Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels zu erhalten, wurden auch Glykogengehalt des Fettkörpers, Zuckerkonzentrationen der Hämolymphe und andere Parameter verfolgt. Ein besonderes Stoffwechselprodukt der Insekten ist das aus N-Acetylglucosaminmolekülen bestehende Chitin. Im Exoskelett können recht große Kohlenhydratmengen als Chitin vorliegen (ZALUSKA, 1959; HETTICK und BADE, 1979); deshalb wurden die Mengen dieses Zuckerderivats bestimmt. Während der Larvalentwicklung werfen Insekten bei Häutungen Teile des Exoskeletts ab; in dieser Zeit können die Tiere keine Nahrung aufnehmen. Deshalb wurde untersucht, wie Hunger die Aktivitäten der Fettkörperglykogenphosphorylase beeinflusst und welche Auswirkungen auf den Kohlenhydratstoffwechsel in Fettkörper und Hämolymphe zu beobachten sind. Besonderes Augenmerk sollte darauf gelegt werden, ob die Cc von *Manduca sexta* an der Regulation der Aktivierungen der Glykogenphosphorylase beteiligt sind und welche Parameter die Ausschüttung des Phosphorylase aktivierenden Faktors aus den Cc in die Hämolymphe beeinflussen.

In den Cc von *Manduca sexta* wurde ebenfalls eine Substanz mit adipokinetischer Aktivität nachgewiesen (ZIEGLER, 1980; ZIEGLER, in Vorbereitung); diese Substanz bewirkt eine Erhöhung der Lipidkonzentration der Hämolymphe nur in adulten Tieren und nicht in Larven (ZIEGLER, 1980; ZIEGLER, in Vorbereitung). Trotzdem wurden auch Veränderungen im Lipidstoffwechsel von Fettkörper und Hämolymphe während der späten Larvalentwicklung und des Hungerns von Larven untersucht, um Erkenntnisse über die relative Bedeutung von Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel während dieses Entwicklungsabschnittes bei *Manduca sexta* zu sammeln.

Um ein Maß für die Stoffwechselintensität von *Manduca sexta* während der späten Larvalentwicklung und des Hungerns zu erhalten, wurde der Sauerstoffverbrauch gemessen. Aus den Werten der Kohlendioxidabgabe wurde unter Berücksichtigung des Respiratorischen Quotienten (RQ) die Menge der im Stoffwechsel oxidierten Substrate berechnet.

2. Abkürzungen

AKH	Adipokinetisches Hormon
A-3:5-MP	cAMP; Adenosin-3':5'-monophosphat oder Adenosin-3':5'-monophosphorsäure
A-5-MP	AMP; Adenosin-5'-monophosphat oder Adenosin-5'-monophosphorsäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat oder Adenosin-5'-triphosphorsäure
Bidest.	doppelt destilliertes Wasser
Bq	Becquerel (= 1 Kernzerfall/Sekunde)
Cc	Corpus cardiacum oder Corpora cardiaca
Ca	Corpus allatum oder Corpora allata
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Äthylendinitrilotetraessigsäure
f.b.Z.	für biochemische Zwecke
FFA	freie Fettsäure(n)
g	Erdbeschleunigung (= 9.80 m/sec ²)
hum.	human
L	Larvenstadium
n	Anzahl der Meßwerte
NADP und NADPH	oxidiertes und reduziertes β -Nicotinamid-adenindinucleotidphosphat
p	Probability = Wahrscheinlichkeit
P	Puppenzeit
p.A.	pro analysi = zur Analyse
PA	Pharatadultzeit
pharm.	für pharmazeutische Zwecke
PP	Pharatpuppenzeit

RQ	Respiratorischer Quotient (stündliche CO_2 -Produktion/stündliche O_2 -Aufnahme)
S.E.M.	Standardfehler des Mittelwertes
TEA	Triäthanolamin
U	Einheit der Enzymaktivität der Fettkörperglykogenphosphorylase (1 U = 1 nMol Substratumsatz NADP/min)
V	Volumen

3. Material und Methoden

3.1. Tierhaltung

Larven von *Manduca sexta* wurden nach einer Vorschrift von Prof. Dr. L. M. Riddiford (persönliche Mitteilung) gehalten; diese Vorschrift entspricht der Beschreibung von TRUMAN (1972). Die Haltung der adulten Tiere ist bereits beschrieben worden (SIEGERT, 1980). Larven wurden mit einer künstlichen Diät *ad libitum* gefüttert; dieses Futter stellt eine Veränderung der von HOFFMAN, LAWSON und YAMAMOTO (1966) für *Manduca sexta* entwickelten Diät dar. Das Futter wurde etwa alle 3 Tage frisch hergestellt; es enthielt pro 1 l Bidest. die folgenden Substanzen in den angegebenen Mengen.

20	g	Agar Agar (gepulvert; Merck 1615)
4	g	L(+)-Ascorbinsäure (p.A.; Merck 127)
80	g	Weizenkeime (Dr. Ritter GmbH, Köln)
16	g	Trockenhefe (Ohly GmbH, Hamburg)
36	g	Casein (alkalilöslich; Merck 2241)
32	g	Saccharose (reinst; Merck 7653)
1	g	4-Hydroxybenzoesäuremethylester (Merck 6757)
2	g	Sorbinsäure (Merck 662)
3.5	g	Cholesterin (reinst; Merck 3670)
0.2	g	Streptomycinsulfat (Boehringer 109 355)
		Salze (insgesamt 12 g)
2.52	g	CaCO_3 (gefällt; p.A.; Merck 2066)
0.0047	g	$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ (p.A.; Merck 2790)
0.176	g	Fe(III)PO_4 (annähernd, gegläht, gekörnt; Merck 3935)
0.0024	g	$\text{MnCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ (p.A.; Merck 5934)
1.08	g	$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ (p.A.; Merck 5886)
0.0011	g	$\text{KAl(SO}_4)_2 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$ (p.A.; Merck 1047)
1.44	g	KCl (p.A.; Merck 4936)

3.72	g	KH_2PO_4 (p.A.;Merck 4873)
0.0006	g	KJ (neutral,p.A.;Merck 5043)
1.26	g	NaCl (p.A.;Merck 6404)
0.0068	g	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ (trocken,rein;Merck 2143)
		Vitamine (insgesamt 0.0221 g)
0.01	g	Nicotinsäure (f.b.Z.;Merck 6817)
0.005	g	Riboflavin (f.b.Z.;Merck 7609)
0.0023	g	Thiaminhydrochlorid (pharm.;Serva 36020)
0.0023	g	Pyridoxolhydrochlorid (f.b.Z.;Merck 7527)
0.0023	g	Folsäure (f.b.Z.;Merck 3984)
0.0002	g	D(+)-Biotin (f.b.Z.;Merck 24514)
0.74	ml	Formaldehyd (etwa 37 %ig;Merck 4002)
4	ml	Leinöl (Linosan,kaltgepreßt,unraffiniert;Neuköllner Ölmühle GmbH)

Die Salze wurden zu einer Vormischung zusammengegeben;ebenso die Vitamine, die in 10 ml Bidest. enthalten waren.Das Formaldehyd wurde als 3.7 %ige Lösung verwendet.

Larven von *Manduca sexta* wurden in Kühlbrutschränken der Fa. Rubarth (Hannover) aufgezogen.Geschlüpfte Larven wurden einzeln in kleine Plastikschaalen ($V = 25 \text{ ml}$,Polystyrol,Sarstedt 75 568) mit etwa 7 g frischer Diät gesetzt.Nach ungefähr 10 Tagen hatten die Tiere ein Gewicht von etwa 1 g erreicht und traten in das 5. Larvenstadium ein.Sie wurden dann in größere Becher ($V = 300 \text{ ml}$,PVC,Fiwoplastik,Worms) mit etwa 30 g frischer Diät transferiert.Nach weiteren 4 Tagen beendeten die Tiere die Freßphase und begannen die Wanderphase.Sie wurden dann bis zur Verpuppung in Holzblöcken aufbewahrt, die $7 \times 2.2 \text{ cm}$ große Bohrungen enthielten.Puppen wurden in Plastikschaalen aufbewahrt,die mit Kleenextüchern ausgeschlagen waren.

3.2. Präparation der Versuchstiere und Aufarbeitung von Hämolymphe, Fettkörper und Kutikula

Um eine Standardisierung der verwendeten Versuchstiere möglich zu machen, wurde für die späte Larvalentwicklung von *Manduca sexta* eine Gewichtskurve aufgenommen (Abb. 1). An Hand der Werte, die dieser Kurve zugrunde liegen, wurden Larven zwischen 9 und 12 Uhr ausgewählt. Tiere, die zwischen 21 und 22 Uhr untersucht wurden, wurden so ausgewählt, daß ihre Körpergewichte ziemlich genau zwischen den Werten für 9 Uhr desselben und des folgenden Tages lagen. Bei Hungerversuchen wurden nur solche Tiere benutzt, die am 3. Tag des 5. Larvenstadiums zwischen 9 und 10 Uhr ein Gewicht von 6 bis 7 g erreicht hatten (Abb. 1). Die Versuchstiere wurden nicht nach ihrem Geschlecht ausgewählt, obwohl eine Unterscheidung möglich gewesen wäre (STEWART, BAUMHOVER, BENNETT und HOBGOOD, 1970).

Bei der Gewinnung von Hämolympfproben wurden die Larven in einem Wachsbett an Kopf und After auf einem Stück Parafilm festgesteckt, ein Abdominalbein an- oder das Abdominalhorn abgeschnitten und die austretende Hämolymphe mit einer Pasteurpipette aufgenommen. Nach dem Öffnen der Tiere konnten Fettkörperproben leicht entnommen werden. Die Präparation der Puppen wurde bereits beschrieben (SIEGERT, 1980).

3.2.1. Aufarbeitung von Hämolympfproben

Von den Hämolympfproben wurden Aliquots in Reaktionsgefäße (Fa. Eppendorf) mit einem Kristall N-Phenylthioharnstoff gegeben und nach kräftigem Schütteln in einem Eisbad aufbewahrt. Nach Zentrifugation (10 min, 10 000 x g) wurden vom Überstand die benötigten Volumina für die Bestimmungen abgenommen. N-Phenylthioharnstoff stört in den auftretenden Konzentrationen weder Protein- noch Lipid-, Glucose-, Fructose- oder Gesamtzuckerbestimmung.

3.2.1.1. Aufarbeitung der Hämolymphe für die Zuckerbestimmungen

Im ersten Teil der Arbeit wurden die Zucker aus 20 bis 50 µl Hämolymphe

wie beschrieben zweimal mit 2 ml 80 %igem Äthanol extrahiert (SIEGERT,1980). Für die Bestimmung der Glucose- und Fructosekonzentration wurde die Hämolymphe mit 0.33 N Perchlorsäure enteiweißt. Kontrollen zeigten, daß Perchlorsäure weder die Gesamtzuckerbestimmung mit dem Anthronreagens noch die enzymatische Glucose- und Fructosebestimmung stört, sodaß aus einer Probe Glucose-, Fructose- und Trehalosekonzentration gleichzeitig bestimmt werden konnten.

Generell wurden 100 µl Hämolymphe mit 500 µl Perchlorsäure gemischt und zentrifugiert (10 min, 12 000 x g). Der Überstand wurde dekantiert und für Glucose- und Fructosebestimmung (3.3.1.) unverdünnt, zur Gesamtzuckerbestimmung (3.3.2.) 1 : 30 mit Bidest. verdünnt verwendet.

3.2.1.2. Aufarbeitung der Hämolymphe für die Lipidbestimmung

Hämolymphlipide wurden aus 100 µl zweimal mit 2 ml Chloroform:Methanol (2:1) extrahiert. Nach jeweils 24 stündiger Extraktion und Zentrifugation (30 min, 1 500 x g) wurden die Überstände vereinigt und mit 2 ml Salzlösung (0.4 % $\text{CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$; 0.34 % $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$; 5.8 % NaCl) versetzt. Nach erneuter Zentrifugation wurde die methanolische Phase abgesaugt, die Chloroformphase bei 55 °C im Trockenschrank eingeengt und die Probe zur Lipidbestimmung (3.3.3.) benutzt.

3.2.1.3. Aufarbeitung der Hämolymphe für die Proteinbestimmung

Die Aufarbeitung der Hämolymphe für die Proteinbestimmung wurde bereits genau beschrieben (SIEGERT,1980). Die Hämolympheproteine wurden mit Trichloressigsäure (Endkonzentration 6.25 %) gefällt und das Sediment für die Bestimmung verwendet (3.3.6.).

3.2.2. Aufarbeitung von Fettkörperproben

Die Entnahme und Aufarbeitung von Fettkörperproben zur Bestimmung der Glykogenphosphorylaseaktivität, des Trockengewichts und der verschiedenen Stoffe in diesem Organ wurde bereits beschrieben (SIEGERT,1980). Entnommene Fett-

körperproben wurden zunächst in einer Insektensalzlösung ($15 \text{ mM MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$; 0.4 mM NaCl ; 110 mM KCl ; $4 \text{ mM CaCl}_2 \times \text{H}_2\text{O}$; $5 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$; pH 6.5 ; JUNGREIS, JATLOW und WYATT, 1973) gespült und entweder sofort weiterverarbeitet oder gefriergetrocknet. Für die Bestimmung der intrazellulären Zuckerkonzentration wurde der Fettkörper nicht in Insektensalzlösung gespült.

3.2.2.1. Aufarbeitung von Fettkörperproben für die Glykogenbestimmung

Die Glykogenbestimmung aus gefriergetrocknetem Fettkörper wurde bereits beschrieben (SIEGERT, 1980). Der gefriergetrocknete Fettkörper wurde in 40 %iger Kalilauge homogenisiert und 60 min gekocht; das im Mazerat enthaltene Glykogen wurde mit Athanol (Endkonzentration 70 %) gefällt, mit Bidest. aufgenommen und mit dem Anthronreagens nachgewiesen (3.3.2.)

3.2.2.2. Aufarbeitung von Fettkörperproben für die Lipidbestimmung

Gefriergetrockneter Fettkörper wurde wie beschrieben gewonnen und mit einem Spatel fein zerteilt und in trockene Homogenisationszylinder (Potter-Elvehjem) eingewogen. Homogenisiert wurde der Fettkörper in 1.5 ml Chloroform:Methanol (2:1) und der Teflonstempel mit 1.5 ml Chloroform:Methanol gespült. Das Homogenat wurde über Nacht bei Raumtemperatur stengelassen. Nach Zentrifugation (30 min, $1500 \times g$) und Dekantierung des Überstandes wurde das Sediment nochmals 24 h mit 2 ml Chloroform:Methanol (2:1) extrahiert, die Überstände vereint und mit 2.5 ml Salzlösung (s. 3.2.1.2.) versetzt und gut geschüttelt. Nachdem durch erneute Zentrifugation Phasentrennung erreicht worden war, wurde die methanolische Phase abgesaugt und die Chloroformphase in vorgewogene Wägegläser gegeben. Das Zentrifugenglas wurde zweimal mit je 1 ml Chloroform gespült, die Überstände im Wägeglas vereinigt und bei 55 bis 60 °C eingengt. Nach der Trocknung wurde die extrahierte Fettmenge auf der Analysenwaage ermittelt. Da die wäßrige Phase nicht vollständig abgesaugt werden kann und durch das in ihr enthaltene Salz Fehler entstehen, wurden entspre-

chende Kontrollen stets parallel aufgenommen, um deren Werte die Meßwerte korrigiert wurden.

3.2.2.3. Aufarbeitung von Fettkörperproben für die Proteinbestimmung

Gefriergetrockneter Fettkörper wurde mit 1 ml Medium (50 mM TEA ; 5 mM EDTA ; 20 mM NaF ; 1 mM N-Phenylthioharnstoff ; pH 7.0) homogenisiert und zentrifugiert (10 min, 13 000 x g). Der Überstand wurde nochmals zentrifugiert (10 min, 10 000 x g); anschließend wurden Aliquots mit einem gleichen Volumen 12.5 %iger Trichloressigsäure gefällt (SIEGERT, 1980) und die Proteine bestimmt (3.3.6.).

3.2.2.4. Aufarbeitung von Fettkörperproben für die DNA-Bestimmung

Fettkörperproben wurden wie beschrieben entnommen und DNA nach LINZEN und WYATT (1964 - modifiziert) extrahiert. Der lyophilisierte Fettkörper mußte innerhalb von 24 h nach der Präparation aufgearbeitet werden, da er sonst nicht einwandfrei homogenisiert werden konnte.

Fettkörperproben wurden in trockene Homogenisationsgefäße eingewogen und mit 2 ml 0.3 N Perchlorsäure unter Eiskühlung homogenisiert. Glasgefäß und Teflonkolben wurden zweimal mit jeweils 2 ml Perchlorsäure gespült. Nach Zentrifugation (10 min, 30 000 x g) wurde das Sediment dreimal mit jeweils 5 ml 0.3 N Perchlorsäure gewaschen. Das Sediment wurde mit einem Glasstab möglichst fein verteilt und weiterhin einmal mit 5 ml absolutem Äthanol, zweimal mit 5 ml Äthanol:Diäthyläther (3:1) bei 37 °C und zweimal mit 5 ml Diäthyläther extrahiert und jeweils zentrifugiert (s.o.). Das getrocknete Sediment wurde mit einem Tropfen Methanol:Diäthyläther (1:1) angefeuchtet und die DNA mit 1 ml 10 %iger Perchlorsäure bei 70 °C für 20 min extrahiert. Nach Zentrifugation wurde die Extraktion zweimal mit je 1 ml 10 %iger Perchlorsäure wiederholt und die Überstände für die Bestimmung (3.3.4.) vereinigt.

3.2.2.5. Aufarbeitung von Fettkörperproben für die Messung der Glykogenphosphorylaseaktivität

Frisch präparierter Fettkörper wurde mit etwa 1.5 ml Medium (s. 3.2.2.3.) homogenisiert und zentrifugiert (10 min, 13 000 x g). Der Überstand wurde nochmals bei 10 000 x g geschleudert und dann für die Aktivitätsmessung (3.3.5) benutzt.

3.2.2.6. Aufarbeitung von Fettkörperproben zur Extraktion der intrazellulären Zucker

Für die Bestimmung der intrazellulären Zuckerkonzentrationen wurde der Fettkörper entnommen und durch Abtupfen auf Filterpapier so gut wie möglich von anhaftender Hämolymphe befreit und sofort eingefroren und gefriergetrocknet. Dieses Vorgehen sollte verhindern, daß intrazelluläre Zucker bei der Behandlung in Insektensalzlösung herausgespült werden (JUNGREIS und WYATT, 1972). Die Zucker der anhaftenden Hämolymphe wurden bei der Bestimmung berücksichtigt. Mit radioaktiv markiertem Inulin wurde festgestellt, daß pro mg so präpariertem Fettkörper etwa 0.18 µl Hämolymphe haften bleiben (ZIEGLER, unveröffentlicht).

Der gefriergetrocknete Fettkörper wurde fein zerteilt und in 2 ml 80 %igem Äthanol homogenisiert. Teflonstempel und Homogenisationsgefäß wurden zweimal mit je 1 ml Äthanol gespült. Nach 24 stündiger Extraktion bei Raumtemperatur und Zentrifugation (30 min, 1 500 x g) wurde der Überstand bei 55 bis 60 °C eingeengt, das Sediment nochmals mit 2 ml Äthanol für 24 h bei Raumtemperatur extrahiert, die Überstände vereinigt und zur Trockne gebracht. Die Proben wurden für die Bestimmung (3.3.2.) mit 2 bis 5 ml Bidest. aufgenommen und im Ultraschallbad gelöst. Lipide wurden mit 2 ml n-Hexan entfernt; der Verlust an Kohlenhydraten durch diese Behandlung betrug etwa 0.5 %.

3.2.3. Aufarbeitung der Kutikula zur Chitosanbestimmung

Die verwendete Methode wurde von HETTICK und BADE (1979) beschrieben, jedoch in einigen Punkten modifiziert. Bei der Präparation der Tiere wurde darauf geachtet, daß das Integument zusammenhängend blieb. Darm, Fettkörper etc. wurden mit einer gekrüpfen Pinzette herausgeschabt und der Rest des Tieres in kalter Natronlauge gespült. Dann wurde das Integument 45 min mit 100 ml 10 %iger Natronlauge bei 80 °C inkubiert und dabei geschüttelt. Nach kräftigem Spülen in Bidest. wurden die Proben 45 min bei Raumtemperatur mit 30 ml 90 %iger Ameisensäure behandelt. Kontrollversuche zeigten, daß eine nochmalige Extraktion notwendig ist, um letzte Verunreinigungen aus dem Präparat zu entfernen. Die gut mit Bidest. gespülten Proben wurden bei 70 °C getrocknet und ihr Gewicht auf einer Analysenwaage festgestellt; der so gewonnene Wert stellt die Gesamtmenge des kutikulären Chitosan dar (durch die beschriebene Extraktion werden vom Chitin die N-Acetylreste abgespalten und es entsteht Chitosan).

Die von Larven gewonnenen Proben sind weißlich, tragen jedoch schwarze Punkte, die wahrscheinlich aus nicht extrahierten Proteinen bestehen und den lateralen Zeichnungen der einzelnen Segmente entsprechen. Die von Puppen gewonnenen Proben sind bräunlich und ähneln so dem nativen Zustand. Diese Proben enthalten eine nicht einschätzbare Menge an Proteinen.

3.3. Quantitative Bestimmungen

3.3.1. Enzymatische Glucose- und Fructosebestimmung

Die angewendete Methode wurde bereits von GROWE (1980) beschrieben, jedoch etwas modifiziert; sie basiert auf einer Vorschrift von SCHMIDT (1961).

100 µl des perchlorsauren Überstandes (3.2.1.1.) wurden mit 500 µl Puffer (316 mM TEA x HCl ; 4.1 mM $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$; 0.5 mM Na_2NADP ; 0.7 mM $\text{Na}_2\text{ATP} \times 3.5 \text{ H}_2\text{O}$; pH 7.5) in einer Halbmikroküvette vermischt und die Extinktion (E_1) bei 340 nm gemessen. Nach Zugabe von 1 U Hexokinase und ca. 0.5

U Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, enthalten in 10 μ l 3.2 M Ammonsulfatlösung ("mixed enzymes"; Sigma GmbH), wurde die Einstellung des Gleichgewichts abgewartet und E_2 abgelesen. Durch Zugabe von 1 U Phosphoglucose-Isomerase (in 10 μ l 3.2 M Ammonsulfatlösung) wurde die in der Probe vorhandene Fructose umgesetzt und E_3 abgelesen. Aus den Differenzen ($E_3 - E_2$) und ($E_2 - E_1$) und dem Molaren Extinktionskoeffizienten für NADPH ($6.22 \times 10^6 \text{ cm}^2 \times \text{Mol}^{-1}$ bei 340 nm) konnten die Fructose- bzw. die Glucosekonzentrationen der Hämolymphe berechnet werden.

3.3.2. Zuckerbestimmung mit Anthronreagens

Die Zuckerbestimmung mit dem Anthronreagens wurde bereits beschrieben (SIEGERT, 1980). Von den gewonnenen Proben (3.2.1.1.) wurden jeweils 200 μ l zum Test eingesetzt und mit 1 ml Anthronreagens (1.6 mg Anthron/ml 80 %ige Schwefelsäure; MOKRASCH, 1954) versetzt. Nach 15 min bei etwa 100 °C wurde die Extinktion bei 620 nm gemessen. Glucose wurde als Referenzsubstanz benutzt.

3.3.3. Lipidbestimmung mit dem Sulphophosphovanillinreagens

Das getrocknete Sediment (3.2.1.2.) wurde mit 1 ml konzentrierter Schwefelsäure für 10 min gekocht. 100 μ l dieser Probe wurden mit 1 ml Phosphovanillin-Reagens (13 mM Vanillin; 14 M Phosphorsäure) vermischt (ZÖLLNER und KIRSCH, 1960). Die Extinktion der Proben wurde nach 30 min bei Raumtemperatur gegen den Nullwert bei 546 nm gemessen. Als Referenzsubstanz diente Cholesterin (STONE und MORDUE, 1980) in einer Konzentration von 10 mg/ml Methanol; auch dieser Standard wurde vor Gebrauch mit Schwefelsäure behandelt (50 μ l Standard + 1 ml Schwefelsäure).

Zur Lipidbestimmung wurden Testkits benutzt (Boehringer Mannheim).

3.3.4. DNA-Bestimmung mit dem Diphenyl-Eisessig-Reagens

Der quantitative DNA-Nachweis mit dem Diphenylamin-Eisessig-Reagens wurde nach BURTON (1955) in der Modifikation von GILES und MYERS (1965)

durchgeführt. 500 µl der perchlorsauren Probe (3.2.2.4.) wurden mit 500 µl Reagens (4 % Diphenylamin in Eisessig) und 50 µl Acetaldehydlösung (0.8 %ige wäßrige Lösung) versetzt. Nach 24 stündiger Inkubation bei 30 °C wurde die Extinktion bei 595 nm gegen den Leerwert gemessen.

Als Referenzsubstanz diente Desoxyribonucleinsäure aus Kälberthymus. Die Standardlösung hatte eine Konzentration von 400 µg/ml 5 mM Natronlauge. Vor dem Test wurde dieser Standard mit einem gleichen Volumen 20 %iger Perchlorsäure versetzt und für 15 min auf 70 °C erhitzt.

Bestimmungen mit innerem Standard zeigten, daß nicht immer 100 % Ausbeute bei den Extraktionen erreicht wurden. Die Meßwerte wurden um die entsprechenden Prozentwerte korrigiert.

3.3.5. Messung der Glykogenphosphorylaseaktivitäten

Die Aktivitätsmessung der Fettkörperglykogenphosphorylase wurde in einem gekoppelten Test mit Phosphoglucomutase und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase als Hilfsenzyme in Richtung des Glykogenabbaus durchgeführt. Die Methode wurde von CHILDRESS und SACKTOR (1970) beschrieben, jedoch modifiziert (SIEGERT, 1980). Die Bildung von NADPH wurde photometrisch bei 334 nm verfolgt. Zunächst wurde die aktive Form in Abwesenheit, dann die Gesamtaktivität der Phosphorylase in Anwesenheit von A-5-MP gemessen. 1 Unit wurde als die Phosphorylaseaktivität definiert, die unter den herrschenden Versuchsbedingungen die Reduktion von 1 nmol NADP zu NADPH pro Minute hervorruft.

3.3.6. Proteinbestimmung

Die auf einer Vorschrift von LAYNE (1956) beruhende Proteinbestimmung wurde bereits im Detail beschrieben (SIEGERT, 1980).

Die mit Trichloressigsäure (Endkonzentration 6.25 %) gefällten Proteine wurden mit 1 ml Biuret-reagens (21.25 mM $C_4H_4O_6KNa \times H_2O$; 6 mM $CuSO_4 \times 5 H_2O$; 750 mM NaOH) aufgenommen, die Lipide mit Petroläther extrahiert und die Extinktion bei 550 nm gemessen. Als Referenzsubstanz wurde eine Standard-

Lösung (Sigma GmbH;54010) mit 50 mg Albumin (hum.) und 30 mg Globulin (hum.) pro ml benutzt.

3.3.7. Bestimmung des Hämolympfvolumens

Das Hämolympfvolumen der Larven von *Manduca sexta* wurde mit Hilfe von Tritium markiertem Inulin bestimmt. 11.5 kBq wurden mit 25 µl Bidest injiziert. Nach 1 h Äquilibration bei Raumtemperatur wurde Hämolymphe wie beschrieben entnommen. 50 µl Hämolymphe wurden mit 500 µl Soluene-350:Isopropanol (1:1) in einem Plastiksintillationsgefäß gemischt (Doppelwerte), kräftig geschüttelt und für 1 h stehengelassen. Dann wurden 10 ml Dimilume-30 dazugegeben, wiederum kräftig geschüttelt und nach dem Abklingen von Chemilumineszenz (ca. 24 h) in einem Tricarbsintillationszähler für 10 min oder 10^4 counts gezählt. Quenchkorrekturen wurden für jede Probe durch Zugabe eines inneren Standards durchgeführt.

3.3.8. Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs und der Kohlendioxidproduktion mit Hilfe der Warburg-Manometrie

Alle zur Manometrie notwendigen Geräte wurden von Fa. B. Braun Melsungen AG bezogen. Die volumenkalibrierten Doppelkapillar-Manometer enthielten Brodie'sche Lösung (10 000 mm Brodie'scher Lösung entsprechen 1 atm) als Manometerflüssigkeit. Als Reaktionsgefäße dienten Sonderanfertigungen mit Volumina zwischen 160 und 190 ml; diese Gefäße bestanden aus zwei eingeschliffenen Glashälften. Alle Schliffe, die die einzelnen Teile des Versuchsaufbaues miteinander verbanden, wurden mit Spezial-Warburg-Fett behandelt. Larven der Freßphase des 4. und 5. Stadiums wurden mit etwa 15 g Diät bei 27 ± 0.1 °C inkubiert; die Äquilibrationszeit betrug etwa 1 h. Um die Meßgenauigkeit bei niedrigem Sauerstoffverbrauch zu erhöhen, wurde das Reaktionsvolumen durch speziell angefertigte Adaptoren aus Trovidur verringert; in diesem Fall erhöhte sich die Äquilibrationszeit auf etwa 2 h. Thermobarometer mit und ohne Futter wurden simultan angesetzt; zwischen beiden bestanden jedoch keine wesentlichen

Unterschiede. Der Sauerstoffverbrauch wurde in Anwesenheit von 1 ml 10 %iger Kalilauge (Bunsenscher Absorptionskoeffizient für Sauerstoff 0.029 ml O_2 /ml) gemessen, während zur Ermittlung der Kohlendioxidproduktion die Differenz aus Volumenveränderung in Abwesenheit und Anwesenheit von Kalilauge benutzt werden mußte.

Das spezifische Gewicht für Versuchstiere und Futter wurde mit 1 g/cm³ angenommen; das für Trovidur beträgt 1.4 g/cm³. Filterpapier (Fa. Whatman, No. 1, spezifisches Gewicht 0.5 g/cm³) wurde zur Oberflächenvergrößerung der Kalilauge verwendet.

Nach der entsprechenden Äquilibrationszeit wurden die Druckänderungen dreimal für 15 oder 30 min mit Kalilauge gemessen. Anschließend wurden die Tiere in saubere Reaktionsgefäße ohne Kalilauge umgesetzt oder die Messungen der Druckänderungen erfolgten in umgekehrter Reihenfolge. Neben den stündlichen Werten pro Tier und pro Gramm Körpergewicht konnte so auch für jedes Tier der individuelle Respiratorische Quotient ($RQ = \text{ml } CO_2 \times h^{-1} / \text{ml } O_2 \times h^{-1}$) berechnet werden.

Für die Messungen an hungernden Tieren mußte eine andere als die eben beschriebene Verfahrensweise gewählt werden, da beide Parameter für ein Versuchstier nicht gleichzeitig gemessen werden konnten und der physiologische Zustand hungernder Tiere sich rasch ändert. Es wurden deshalb jeweils zwei Larven gleichen Gewichts ausgewählt; an einem Tier wurde der Sauerstoffverbrauch (+Kalilauge), an dem anderen die Differenz zwischen Sauerstoffverbrauch und Kohlendioxidproduktion (-Kalilauge) gemessen. Nach Beendigung der gesamten Meßreihe wurde der durchschnittliche Sauerstoffverbrauch pro Gramm Tiergewicht für die einzelnen Zeitpunkte der Hungerphase berechnet; aus diesen Werten wurde die Kohlendioxidproduktion pro Gramm Körpergewicht, pro Tier und der RQ berechnet.

Bei hungernden Larven wurde die Atmung zweimal für 15 min gemessen. Die notwendige Äquilibrationszeit von 1 h führte dazu, daß erst 60 min nach Beginn der Hungerperiode die ersten Meßwerte gewonnen werden konnten. Jeweils zu vol-

len Stunden nach Versuchsbeginn wurden die Messungen begonnen. Während der ersten 3 h wurde stündlich gemessen; in dieser Zeit blieben die Tiere in ihren Reaktionsgefäßen. Die Messungen wurden auf das jeweilige Körpergewicht vor Versuchsbeginn bezogen. Nach 3 h wurden die Tiere (bei den gefütterten Kontrolltieren auch das Futter) neu ausgewogen, ebenfalls nach insgesamt 6 h. Um Koprophagie und Volumenfehler so gering wie möglich zu halten, wurden Kotballen aus den Reaktionsgefäßen entfernt.

3.4. Injektionen

Alle Injektionen wurden mit Mikroliterspritzen der Fa. Hamilton Bonaduz (Länge der Kanüle 30 mm; gauge 33; Spitzentyp 4 und Kolbenführung) durchgeführt.

3.4.1. Injektionen von Corpus cardiacum-Corpus allatum-Extrakten

Die Präparate wurden dankenswerterweise von Prof. Dr. R. Ziegler zur Verfügung gestellt. Das gefriergetrocknete Material wurde in Insektensalzlösung mit 0.1 % Rinderserumalbumin oder Bidest. aufgenommen und so verdünnt, daß die gewünschte Dosis mit 10 µl injiziert werden konnte.

3.4.2. Injektionen von Glucose- und Trehaloselösungen

Gewünschte Mengen der beiden Zucker wurden in Insektensalzlösung gelöst und jeweils 50 µl Lösung injiziert; Kontrolltiere erhielten 50 µl Insektensalzlösung.

3.4.3. Injektionen von Tetrodotoxin

Tetrodotoxin (TTX) ist ein nichtletales Insektenparalytikum (WILLIAMS, 1968). Das Präparat (Boehringer Mannheim) enthielt pro 1 mg TTX 5 mg Zitrat (zur Stabilisierung des pH in wäßriger Lösung bei 4.8 bis 4.9). Injiziert wurden 4 µg TTX/g Körpergewicht (NIJHOUT, 1976). Kontrollen erhielten entsprechende Volumina Zitratlösung.

3.5. Entnahme der Corpora cardiaca und Corpora allata

Die angewendete Methode basiert auf einer Beschreibung von NIJHOUT und WILLIAMS (1974) für die Entfernung der Corpora allata (Ca) aus Larven von *Manduca sexta*. Die Anordnung der Ca und Corpora cardiaca (Cc) zueinander (NIJHOUT, 1975 a; ROHDE, SIEGERT und ZIEGLER, 1982) machte es notwendig, stets die Ca mit den Cc zu entfernen. Vor der Operation wurden die Larven etwa 2 min mit Kohlendioxid betäubt. Das Abdomen wurde während des Eingriffs in einem senkrechten Tubus ständig mit Kohlendioxid umspült. Die Kopfkapsel der Larven wurde mit "Knetsauber" (Fa. Pelikan, für Menschen ungiftig) an der oberen Kante des Tubus so befestigt, daß das Unterschlundganglion oben lag. Der größte Teil der Hämolymphe sammelte sich so im Abdomen. Die gestreckte Epidermis über dem Unterschlundganglion wurde mit einem Satomesser (Fa. Geuder, G-14175) geöffnet und die Hämolymphe etwas abgetrocknet. Nachdem die Muskeln zur Seite geschoben worden waren, waren die Ca leicht als spindelförmige Organe zu erkennen. Die Ca wurden mit feinen Pinzetten (Fa. Dumont, Nr. 4 oder 5) ergriffen und die Nerven durchtrennt, nur der Nervus corporis allati, er verbindet das Cc mit dem Ca, wurde intakt gelassen. Das Ca wurde von den Tracheen weggezogen, wodurch das Cc deutlich als milchiger Punkt erkennbar wurde. Das Cc wurde ebenfalls mit einer Pinzette ergriffen und beide Organe zusammen aus dem Tier entfernt. Die gesamte Prozedur dauerte für die Entnahme beider Organpaare etwa 10 bis 12 min; in dieser Zeit blieben die Tiere in CO₂-Betäubung. Die Wunde wurde weder mit N-Phenylthioharnstoff, Streptomycinsulfat (NIJHOUT und WILLIAMS, 1974) noch mit einem Wundkleber behandelt. Bis zur ersten Futteraufnahme nach dem Eingriff dauerte es einige Stunden. Für die Hungerversuche wurden die Larven am 2. Tag des 5. Larvenstadiums operiert; sie hatten etwa 16 bis 20 h Zeit, um sich zu erholen. Nur Tiere, die in dieser Zeit an Körpergewicht zugenommen und Kotballen hergestellt hatten, wurden für Versuche herangezogen. Für die Injektionsversuche, die wie die Hungerversuche am 3. Tag des Stadiums durchgeführt wurden, mußten die Tiere bereits am 1. Tag des Stadiums cardiacetomiert werden, da sonst die Operationswunde bei der Injektion aufbrach.

4. Ergebnisse

4.1. Veränderungen im Stoffwechsel von *Manduca sexta* während der späten Larvalentwicklung

4.1.1. Veränderungen des Körpergewichts, des Hämolympfvolumens und des Fettkörpertrockengewichts

Beim Eintritt in das 5. Larvenstadium wogen die Tiere etwas mehr als 1 g (Abb. 1). Im Laufe der Freßphase nahm das Körpergewicht kontinuierlich zu und erreichte am 4. Tag etwa 8.6 g; dieser Wert wurde auch am folgenden Tag festgestellt. Bis zum 9. Tag ging das Körpergewicht auf 4.9 g zurück. Während die weiblichen Puppen diesen Wert in etwa beibehielten, lagen die Männchen mit ca. 4.3 g unter diesem Wert ($p < 0.01$).

Prof. Dr. R. Ziegler bestimmte das Hämolympfvolumen der Tiere während der späten Larvalentwicklung und stellte mir diese Ergebnisse freundlicherweise zur Verfügung. Das Hämolympfvolumen nahm im betrachteten Zeitraum von etwa 0.5 ml (Tag 2 des 4. Stadiums) auf etwa 3.2 ml (Tag 5 des 5. Stadiums) recht stark zu (Abb. 2). Während der Pharatepuppenzeit ging das Volumen um etwas weniger als die Hälfte auf durchschnittlich 1.8 bis 2 ml zurück.

Bezogen auf das Körpergewicht enthielten die Larven am Ende des 4. bzw. am Anfang des 5. Stadiums mit etwa 0.45 ml/g das größte Hämolympfvolumen. Für die Folgezeit wurden 0.3 bis 0.4 ml/g gefunden.

Von Tag 3 des 4. bis Tag 8 des 5. Larvenstadiums nahm das Fettkörpertrockengewicht von ca. 6 auf 650 mg zu (Abb. 3). Es wurde somit ein Zuwachs auf das über 100fache des Ausgangswertes festgestellt. In den weiblichen Puppen blieb dieser Wert bis zum 2. Tag der Puppenzeit bestehen, während bei den Männchen ein Rückgang auf 490 mg (2. Tag) zu beobachten war.

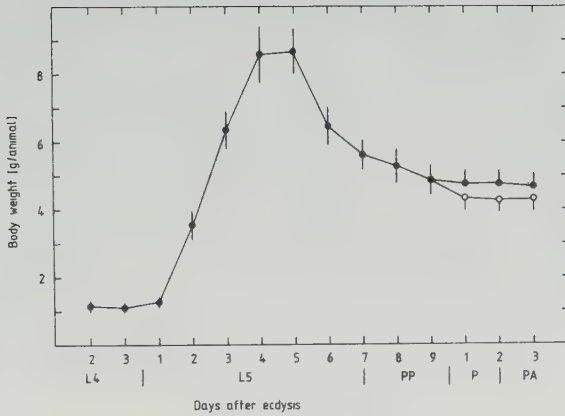


Abb. 1 : Körpergewichte von *Manduca sexta* während der späten Larval- und frühen Puppenzeit. Angegeben wurden die Mittelwerte von jeweils 30 Tieren $\pm$ Standardabweichung. ● Larven und weibliche Puppen ; ○ männliche Puppen.

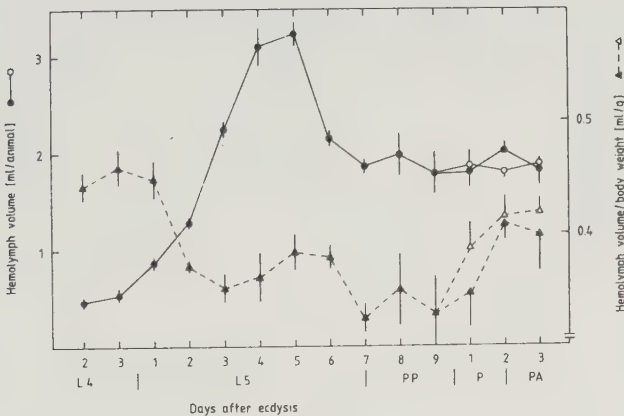


Abb. 2 : Hämolympfvolumina von *Manduca sexta* während der späten Larval- und frühen Puppenzeit. Meßwerte ($n \approx 5$) $\pm$ S.E.M. ●, ▲ Larven und weibliche Puppen ; ○, △ männliche Puppen.

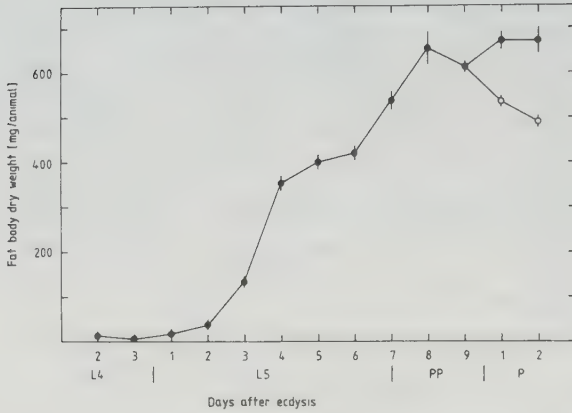


Abb. 3 : Fettkörpertrockengewichte während der späten Larval- und frühen Puppenzeit von *Manduca sexta*. Meßwerte ($n \geq 5$) $\pm$ S.E.M. ● Larven und weibliche Puppen ; ○ männliche Puppen.

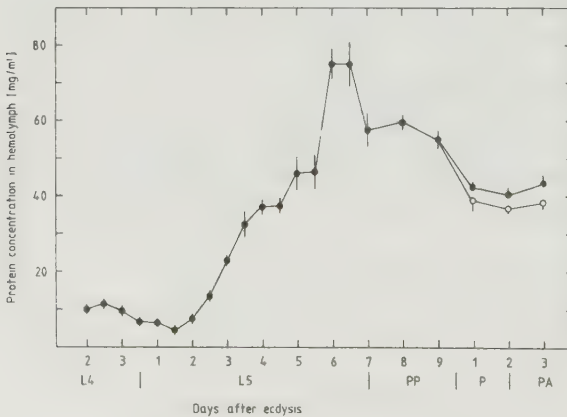


Abb. 4 : Proteinkonzentration in der Hämolymphe von *Manduca sexta* während der späten Larval- und frühen Puppenzeit. Meßwerte ($n \geq 5$) $\pm$ S.E.M. ● Larven und weibliche Puppen ; ○ männliche Puppen.

4.1.2. Veränderungen der Proteinmengen in Hämolymphe und Fettkörper

Von Tag 2 (L 4) bis Tag 2 (L 5) lag die Hämolympheproteinkonzentration mit Werten um und unter 10 mg/ml recht niedrig (Abb. 4). Während der Freßphase war eine kontinuierliche Zunahme der Konzentration zu finden, die innerhalb von 24 h stets signifikant war ($p < 0.01$). Am 6. Tag wurden mit durchschnittlich 75 mg/ml die höchsten Konzentrationen gefunden. Erst in den Puppen lagen die Proteinspiegel der Hämolymphe signifikant niedriger ($p < 0.01$). Die Hämolymphekonzentrationen in beiden Geschlechtern unterschieden sich nicht.

Abb. 6 zeigt, daß die in der Hämolymphe vorhandene Proteinmenge von 5 mg (2. Tag, L 4) auf etwa 160 mg (6. Tag, L 5) erheblich zunahm. Während der Pharatpuppenzeit ging dieser Wert wieder zurück und erreichte in jungen Puppen etwa 60 bis 80 mg.

Der prozentuale Anteil der Proteine am Trockengewicht des Fettkörpers betrug im betrachteten Zeitraum zwischen 5 und 20 % (Abb. 5). Bis zum 5. Tag des 5. Larvenstadiums wurden durchschnittlich etwa 100 µg/mg gefriergetrocknetem Fettkörper, am 5. und 6. Tag als Minimum sogar 60 bis 70 µg/mg gefunden ($p < 0.001$). In der Folgezeit stieg der Proteingehalt stark an und erreichte am 9. Tag mehr als 200 µg/mg ($p < 0.001$). Dieser Wert ging jedoch in der Puppenzeit bis zum 3. Tag signifikant zurück ($p < 0.02$).

Von der Häutung vom 4. zum 5. Larvenstadium bis zum 9. Tag (L 5) nahm die Proteinmenge des Fettkörpers fast kontinuierlich zu und erhöhte sich insgesamt um mehr als den Faktor 100 (Abb. 6). Nur vom 4. zum 5. Tag ging die Proteinmenge um etwa 5 mg von 32 auf 27 mg zurück. Der Fettkörper männlicher Puppen enthielt etwa 20 bis 30 mg weniger Protein als der Fettkörper der Weibchen (110 bis 120 mg).

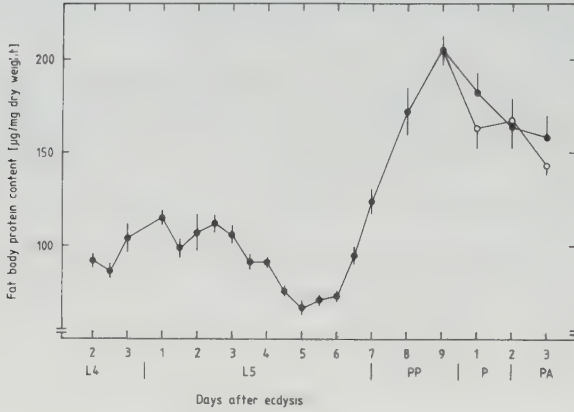


Abb. 5 : Proteingehalt des gefriergetrockneten Fettkörpers von *Manduca sexta* während der späten Larval- und frühen Puppenzeit. Meßwerte ($n \geq 5$) $\pm$ S.E.M.
 ● Larven und weibliche Puppen ; ○ männliche Puppen.

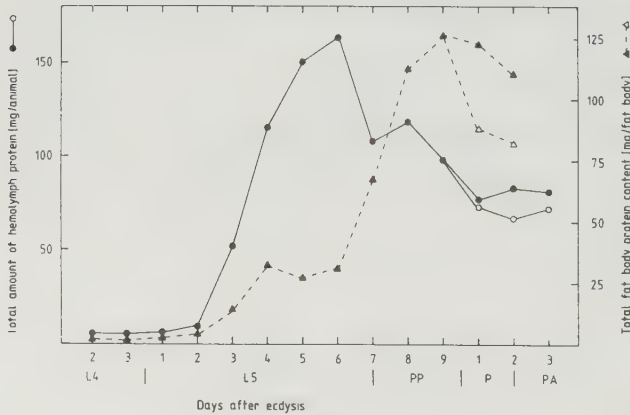


Abb. 6 : Gesamtmengen der Proteine in Hämolymphe und Fettkörper von *Manduca sexta* während der späten Larval- und frühen Puppenzeit. ●, ▲ Larven und weibliche Puppen ; ○, △ männliche Puppen.

4.1.3. DNA-Gehalt des Fettkörpers

Der DNA-Gehalt des gefriergetrockneten Fettkörpers (Abb. 7) betrug während der Beobachtungszeit weniger als 3000 ng/mg. Zwischen Tag 2 und Tag 3 des 4. Larvenstadiums verdoppelte sich der Gehalt von 1160 auf 2490 ng/mg ($p < 0.001$). Während der folgenden Freßphase des 5. Larvenstadiums ging dieser Wert auf etwa 100 ng/mg zurück. Die täglichen Veränderungen waren bis zum 4. Tag statistisch sicherbar ($p < 0.001$). Der DNA-Gehalt des Fettkörpers nahm bis zum 9. Tag des Stadiums auf etwa 450 ng/mg ab ($p < 0.001$). Die männlichen Puppen wiesen mit 250 bis 300 ng/mg einen zeitweise deutlich niedrigeren DNA-Gehalt als der Fettkörper der Weibchen auf ($p < 0.001$). Nur am 3. Tag der Puppenzeit wurden mit etwa 250 ng/mg gefriergetrocknetem Fettkörper gleiche Werte gefunden.

Während der späten Larvalentwicklung von *Manduca sexta* verdoppelte sich die Gesamtmenge der Fettkörper-DNA viermal. Am Ende des 4. Larvenstadiums befanden sich etwa 15 µg DNA im Fettkörper. Vom 1. bis zum 5. Tag des 5. Larvenstadiums konnten dann im Durchschnitt etwa 35 µg DNA pro Fettkörper nachgewiesen werden. Nach weiteren Verdopplungen lagen am 8. und 9. Tag 280 µg DNA pro Fettkörper vor; dieser Wert wurde auch in weiblichen Puppen gefunden. Die Fettkörper der Männchen enthielten mit etwa 140 µg nur die Hälfte DNA.

4.1.4. Aktivitäten der Fettkörperglykogenphosphorylase

Im betrachteten Zeitraum war die spezifische Aktivität der gesamten Fettkörperglykogenphosphorylase großen Veränderungen unterworfen (Abb. 8). Während der Freßphase des 5. Larvenstadiums lag die spezifische Aktivität zwischen 40 und 70 U/mg. Der Rückgang vom 3. Tag des 4. Larvenstadiums (21 Uhr) bis zum 4. Tag des 5. Stadiums (9 Uhr) ist statistisch signifikant ($p < 0.01$), ebenso wie der darauf folgende Anstieg am 5. Tag (21 Uhr; $p < 0.01$). Innerhalb der Pharatpuppenzeit fiel die spezifische Aktivität auf etwa 20 U/mg (9. Tag, 9 Uhr; $p < 0.001$). Dieser Wert veränderte sich in den weiblichen Puppen

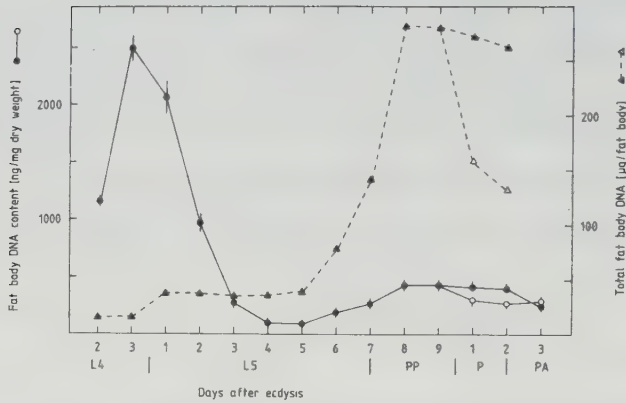


Abb. 7 : DNA-Gehalt des gefriergetrockneten Fettkörpers von *Manduca sexta* während der späten Larval- und frühen Puppenzeit. Meßwerte ($n \geq 5$) $\pm$ S.E.M. ●, ▲ Larven und weibliche Puppen ; o, △ männliche Puppen.

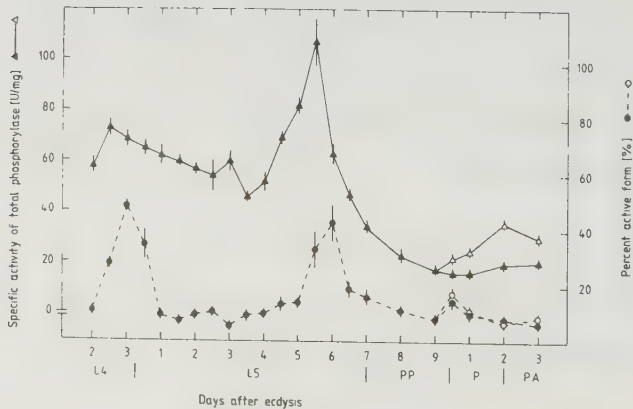


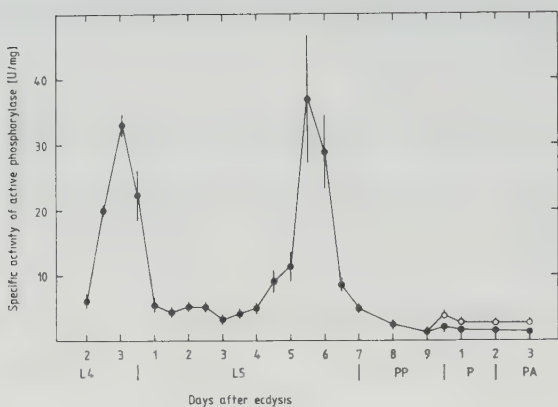
Abb. 8 : Spezifische Aktivitäten der Gesamtform der Fettkörperglykogenphosphorylase und prozentuale Anteile der aktiven Form an der Gesamtaktivität während der späten Larval- und frühen Puppenzeit von *Manduca sexta*. Meßwerte ($n \geq 5$) $\pm$ S.E.M. ●, ▲ Larven und weibliche Puppen ; o, △ männliche Puppen.

nur geringfügig; in den Männchen konnte jedoch eine kurzzeitige, signifikante Erhöhung der spezifischen Aktivität auf 35 U/mg (2. Tag der Puppenzeit ; $p < 0.001$) festgestellt werden.

Ebenfalls in Abb. 8 ist der Verlauf des prozentualen Anteils der aktiven Form der Glykogenphosphorylase dargestellt. Es zeigte sich, daß während der Freßphase des 5. Larvenstadiums und eines Teils von Pharatpuppen- und Puppenzeit etwa 10 % der Phosphorylase in der aktiven Form vorlagen; dieser Wert wurde zweimal während des betrachteten Zeitraums beträchtlich überschritten. Während der Häutung vom 4. zum 5. Larvenstadium wurden etwa 50 % erreicht (3. Tag, L 4,9 Uhr; $p < 0.001$). Der Kurvenverlauf zeigt, daß über einen Zeitraum von etwa 24 h das Enzym zu mehr als 25 % aktiviert war. Während der Wanderphase, wenn die Tiere einen geeigneten Platz zur Verpuppung suchen, stieg der prozentuale Anteil auf bis zu 40 % an ($p < 0.01$). Die Puppenhäutung brachte eine geringfügige Aktivierung des Enzyms auf etwa 15 bis 20 % ($p < 0.02$). Diese Aktivierung scheint jedoch nur kurzfristig und dann auf den Häutungsvorgang beschränkt zu sein.

Während des größten Teils des betrachteten Zeitraumes betrug die spezifische Aktivität der aktiven Form der Glykogenphosphorylase weniger als 10 U/mg (Abb. 9). 30 U/mg wurden während der Häutung von 4. zum 5. Larvenstadium und während der Wanderphase gefunden.

Abb. 8 zeigt recht schnelle Zu- und Abnahmen der spezifischen Aktivität der Gesamtform der Glykogenphosphorylase. Was diese Veränderungen verursachte, war unklar, da sowohl die Enzymaktivität als auch der Proteingehalt im Fettkörper sich verändern können. Es wurde deshalb ein anderes Bezugssystem für die Enzymaktivität gesucht und der DNA-Gehalt des Fettkörpers dafür gewählt (Abb. 7). Da die DNA-Menge des Fettkörpers sich im untersuchten Zeitraum veränderte, erwies auch sie sich als ungeeignete Bezugsgröße. Mit Hilfe mathematischer



Verknüpfungen ließen sich zwar sinnvolle Werte für die Phosphorylaseaktivitäten erstellen, doch ist auch dies aus zwei Gründen eine ungeeignete Angabe. Die DNA-Bestimmung ist sehr aufwendig; wird jedoch DNA als Bezugsgröße verwendet, muß festgestellt werden, ob im betrachteten Zeitraum DNA-Verdopplungen stattfinden; finden welche statt, müssen sie berücksichtigt werden. Um mögliche DNA-Verdopplungen zu erfassen, muß das Fettkörpergesamtgewicht bestimmt werden. Das Fettkörpergesamtgewicht selbst stellt jedoch eine geeignete Bezugsgröße dar. Deshalb wurde durch Kombination der Abbildungen 3, 5 und 8 die Gesamtaktivität der Glykogenphosphorylase pro Fettkörper berechnet und in Abb. 11 dargestellt.

Im betrachteten Zeitraum wurden bis zum 2. Tag des 5. Larvenstadiums etwa 10 U aktive Phosphorylase pro Fettkörper festgestellt (Abb. 10); nur am 3. Tag des 4. Larvenstadiums wurde mit 20 U aktiver Form ein etwa verdoppelter Wert gefunden. Vom 3. Tag des 5. Larvenstadiums stieg die Aktivität kontinuierlich bis zum 6. Tag auf etwa 890 U/pro Fettkörper; in der Folgezeit wurde jedoch ein drastischer Rückgang auf ca. 200 U/Fettkörper festgestellt (9. Tag). In dem untersuchten Teil der Puppenzeit lagen die Werte zwischen 200 und 300 U aktive Phosphorylase pro Fettkörper.

Während der letzten 36 h des 4. und während des 1. Tages des 5. Larvenstadiums wurden etwa 50 bis 100 U Gesamtphosphorylase im Fettkörper gefunden (Abb. 10). Anschließend stieg die Gesamtaktivität kontinuierlich auf 2500 U an (8. Tag). Am 2. Tag nach der Puppenhäutung wurden in den Weibchen 2250, in den Männchen 3000 U pro Fettkörper festgestellt.

4.1.5. Kohlenhydratgehalt in Fettkörper, Hämolymphe und Kutikula

Der prozentuale Anteil des Glykogens am Fettkörpertrockengewicht machte während der Larval- und Puppenzeit durchschnittlich 15 bis 30 % aus, war jedoch starken Veränderungen unterworfen (Abb. 11). Hohe Anteile am Trockenge-

wicht wurden vor der Häutung L4 - L5 und vor der Wanderphase der Larven mit jeweils etwas mehr als 25 % festgestellt. Am Anschluß an diese beiden Zeitpunkte fiel der Glykogengehalt jeweils signifikant ab ($p < 0.001$). Zwischen Tag 3 (L 4) und Tag 3 (L 5) wurden etwa 15 % festgestellt. Im Anschluß an die Wanderphase nahm der Glykogengehalt des Fettkörpers kontinuierlich ab und erreichte am Ende des betrachteten Zeitraums etwa 10 %.

Innerhalb der Freßphase des 5. Larvenstadiums nahm die Glykogengesamtmenge des Fettkörpers um den Faktor 100 zu (von 1 mg (Tag 3, L 4) auf 100 mg (Tag 5, L 5) ; Abb. 11). Der größte Teil der Glykogengesamtmenge wurde zwischen Tag 3 und Tag 5 (L 5) angelegt, nämlich etwa 80 bis 85 mg. Die Gesamtmenge des Glykogen nahm an den Tagen 3 (L 4) und von Tag 5 nach 6 (L 5) ab. Anschließend wurde die jeweils abgebaute Glykogenmenge wieder ergänzt. Im Anschluß an Tag 8 nahm die Glykogenmenge des Fettkörpers beständig zu.

Im Verlauf der späten Larvalentwicklung traten starke Veränderungen der Hämolymphtotalzuckerkonzentration auf (Abb. 12). Die Konzentration fiel während der Häutung L4 - L5 von etwa 12 mg Trehalose/ml auf 6 bis 8 mg/ml ($p < 0.001$). Innerhalb der Freßphase des 5. Stadiums wurden signifikante, tagperiodische Schwankungen zwischen 8 und 14 mg/ml registriert. Am Tag vor der Wanderphase der Larven (Tag 4, L 5) betrug die Konzentration etwa 18 mg/ml und fiel innerhalb von 24 h auf etwa 12 mg/ml; auch in diesem Fall ist der Unterschied signifikant ($p < 0.001$). Im Laufe der Pharatepuppenzeit lag die Konzentration nur wenig höher, erreichte am 9. Tag jedoch fast 19 mg/ml. Dieser Wert fiel anschließend jedoch wieder ab und erreichte am 3. Tag nach der Puppenhäutung etwa 13.5 mg Trehalose/ml ($p < 0.001$).

Die Gesamtmenge der Hämolymphtotalzucker betrug am Anfang des 5. Larvenstadiums etwa 5 mg Trehalose pro Tier (Abb. 12). Diese Menge wuchs bis zum 4. Tag auf etwa 57 mg an. Innerhalb der Pharatepuppen- und Puppenzeit waren 20 bis 30

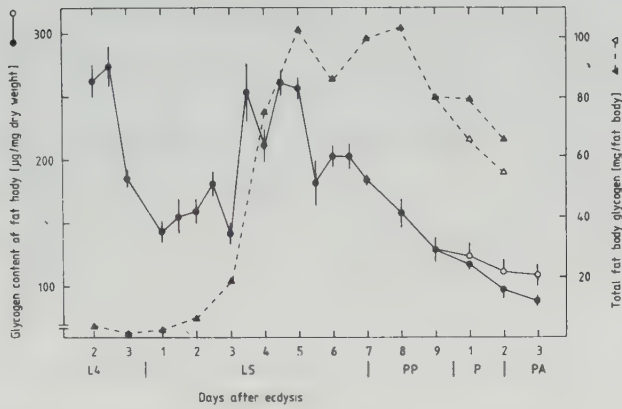


Abb. 11 : Glykogengehalt des gefriergetrockneten Fettkörpers während der späten Larval- und frühen Puppenzeit von *Manduca sexta*. Meßwerte ($n \geq 5$) $\pm$ S.E.M. ●, ▲ Larven und weibliche Puppen ; ○, △ männliche Puppen.

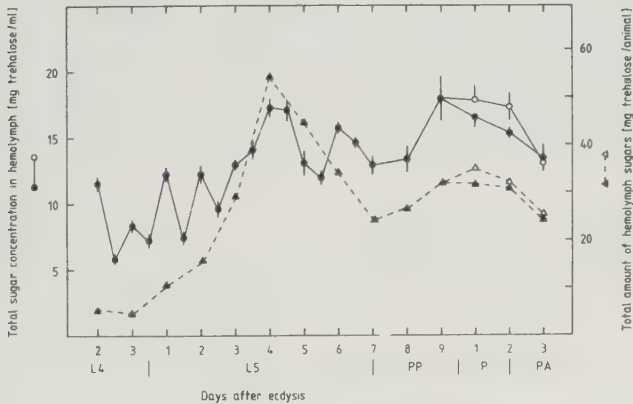


Abb. 12 : Gesamtzuckerkonzentration und Gesamtmenge der Zucker in der Hämolymphe von *Manduca sexta* während der späten Larval- und frühen Puppenzeit. Meßwerte ($n \geq 5$) $\pm$ S.E.M. ●, ▲ Larven und weibliche Puppen ; ○, △ männliche Puppen.

mg Trehalose in der Hämolymphe vorhanden.

Am 2. Tag des 4. und am Anfang des 5. Larvenstadiums lag die Glucosekonzentration der Hämolymphe mit etwa 1000 µg/ml recht hoch (Abb. 13). Während der Häutung vom 4. zum 5. Larvenstadium erreichte sie jedoch mit 300 µg/ml ein kurzfristiges Minimum ($p < 0.001$). Vom 1. bis zum 6. Tag des 5. Stadiums fiel die Konzentration stetig auf ein Niveau von etwa 150 µg/ml ab ($p < 0.001$). Dieser Wert wurde nur am 9. Tag wesentlich überschritten ($p < 0.001$).

Während der Freßphase des 5. Larvenstadiums waren etwa 800 bis 1500 µg Glucose in der Hämolymphe vorhanden (Abb. 13). Am Ende des 4. Larvenstadiums und im Laufe der Pharatepuppen- und Puppenzeit wurden weniger als 600 µg Glucose gefunden. Während der Häutung L4 - L5 und nach Beginn der Wanderphase der Larven nahm die Glucosemenge in der Hämolymphe stark ab.

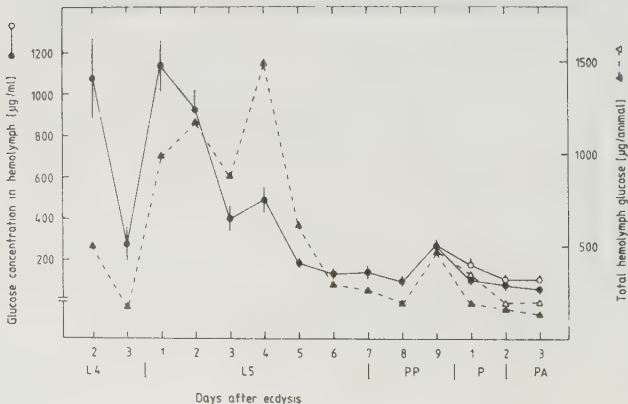


Abb. 13 : Konzentration und Gesamtmenge der Glucose in der Hämolymphe von *Manduca sexta* während der späten Larval- und frühen Puppenzeit. Meßwerte ($n \geq 5$) $\pm$ S.E.M. ●, ▲ Larven und weibliche Puppen ; o, △ männliche Puppen.

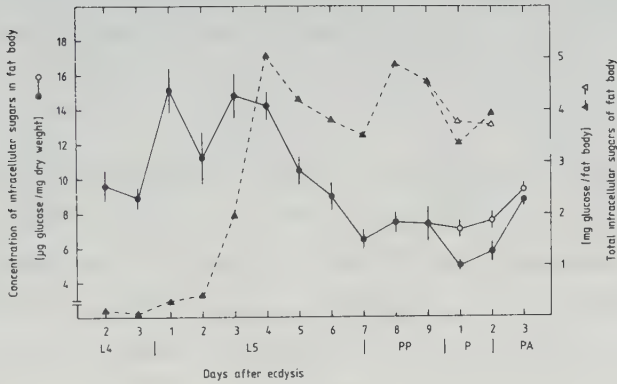


Abb. 14 : Konzentration und Gesamtmenge der intrazellulären Zucker im gefriergetrockneten Fettkörper von *Manduca sexta*. Meßwerte ($n \geq 5$) $\pm$ S.E.M. $\bullet$, $\blacktriangle$ Larven und weibliche Puppen ; $\circ$, $\triangle$ männliche Puppen.

Da die intrazellulär im Fettkörper vorhandenen freien Zucker an der Regulation von Aktivierung und Inaktivierung der Glykogenphosphorylase beteiligt sein könnten, wurden die Konzentrationen der mit 80 %igem Äthanol extrahierbaren Kohlenhydrate bezogen auf das Fettkörpertrockengewicht ermittelt.

Während der Freßphase des 5. Larvenstadiums betrug die Konzentration der intrazellulären Zucker im Durchschnitt zwischen 10 und 16 μg Glucose-äquivalenten pro mg gefriergetrocknetem Fettkörper (Abb. 14). Am Ende des 4. Larvenstadiums und im Laufe der Pharatpuppen- und Puppenzeit wurden weniger als 10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Fettkörper nachgewiesen. Die beschriebenen Ergebnisse lassen es unwahrscheinlich erscheinen, daß die Veränderungen der intrazellulären Zuckerkonzentrationen im Fettkörper direkt an der Regulation von Aktivierung und Inaktivierung der Glykogenphosphorylase beteiligt sind.

Bis zum 2. Tag des 5. Larvenstadiums betrug die Gesamtmenge der intrazellulären Zucker weniger als 0.5 mg Glucoseäquivalente pro Fettkörper (Abb. 14). Bis zum 4. Tag stieg dieser Wert auf 5 mg pro Fettkörper an und blieb im restlichen Untersuchungszeitraum bei etwa 4 mg pro Fettkörper.

Während des 4. Larvenstadiums betrug der Chitosangehalt der Tiere weniger als 10 mg. Bis zur Häutung nahm der Gehalt der Kutikula leicht zu (Abb. 15); bei der Häutung wurde dann die Exuvie, die etwa 1.6 mg wog, abgeworfen. Im Laufe der Freßphase des 5. Larvenstadiums nahm das Chitosan auf mehr als 100 mg zu (Tag 4). In dieser Zeit waren die täglichen Zunahmen signifikant ($p < 0.001$). Nach weiteren drei Tagen wurde der Maximalwert von 120 mg Chitosan pro Tier erreicht. Innerhalb der folgenden 60 h wurden etwa 80 % der Chitosanmenge abgebaut ($p < 0.002$). Kurz nach der Puppenhäutung konnten etwa 15 mg pro Tier nachgewiesen werden. Zu Beginn der Puppenzeit nahm die Chitosanmenge in beiden Geschlechtern auf etwa 70 mg pro Tier zu ($p < 0.01$). Nur für den 3. Tag konnten deutliche Unterschiede zwischen beiden Geschlechtern gefunden werden ($p < 0.05$).

4.1.6. Lipidgehalt in Hämolymphe und Fettkörper

Bis zum 5. Tag des 5. Larvenstadiums lag die Lipidkonzentration der Hämolymphe durchschnittlich zwischen 1 und 2 mg/ml (Abb. 16). Nur am 3. Tag des 4. Larvenstadiums wurde mit 2.3 mg/ml eine Ausnahme gefunden ($p < 0.01$). Pharatpuppen und Puppen enthielten mit etwa 8 mg/ml ein weit höheres Niveau ($p < 0.001$).

Im Vergleich zu den Tagen 2 (L 4) und 1 (L 5) wurden am 3. Tag des 4. Larvenstadiums mit etwa 1.3 mg doppelt so viele Lipide in der Hämolymphe gefunden (Abb. 16). Von Tag 1 bis Tag 8 wurde im 5. Larvenstadium ein stetes Ansteigen auf 17 mg festgestellt; ein Rückgang auf die Hälfte dieser Lipidmenge folgte.

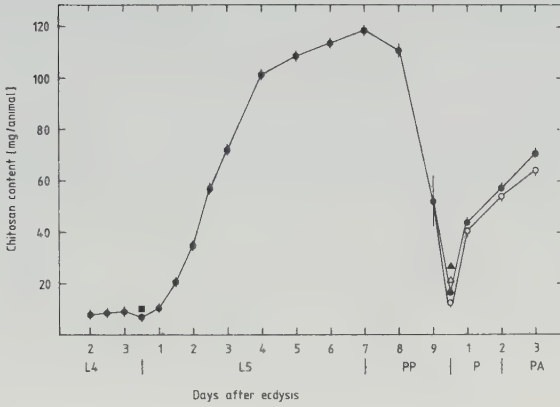


Abb. 15 : Chitosangehalt der Kutikula während der späten Larval- und frühen Puppenzeit von *Manduca sexta*. Meßwerte ($n \geq 5$) $\pm$ S.E.M. ● Larven und weibliche Puppen ; ○ männliche Puppen ; ■ Exuvien der Häutung L4 - L5 ; ▲ , Δ Exuvien der Weibchen und Männchen bei der Puppenhäutung.

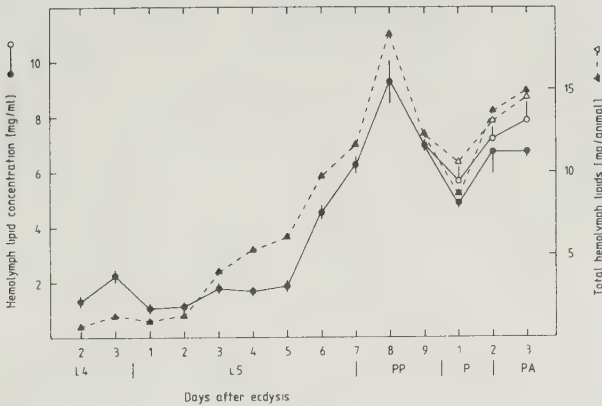


Abb. 16 : Konzentration und Gesamtmenge der Hämolymphlipide während der späten Larval- und frühen Puppenzeit von *Manduca sexta*. Meßwerte ($n \geq 5$) $\pm$ S.E.M. ● , ▲ Larven und weibliche Puppen ; ○ , Δ männliche Puppen.

Während des betrachteten Zeitraumes lag der prozentuale Anteil der Lipide am Trockengewicht des Fettkörpers stets zwischen etwa 30 und 55 % (Abb. 17).

Von Tag 2 (4 mg) des 4. bis Tag 8 (270 mg) des 5. Larvenstadiums nahm die Gesamtlipidmenge des Fettkörpers um den Faktor 70 zu (Abb. 17). Nur von Tag 2 bis Tag 3 (L 4) und von Tag 5 bis Tag 6 (L 5) nahm die Lipidmenge des Fettkörpers etwas ab. Der Fettkörper der Männchen enthielt am Beginn der Puppenzeit etwa 225 mg Lipide, während die Weibchen etwa 270 mg im Fettkörper enthielten.

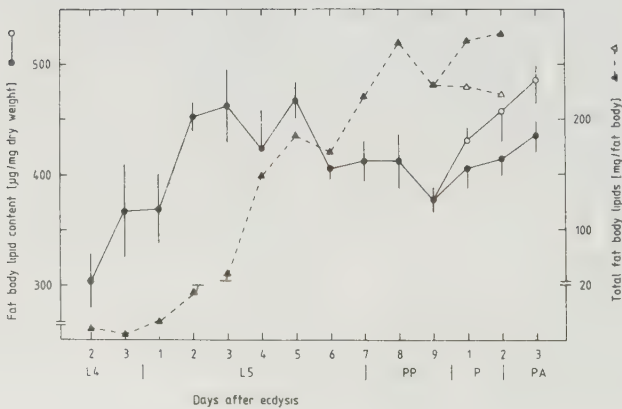


Abb. 17 : Lipidgehalt des gefriergetrockneten Fettkörpers während der späten Larval- und frühen Puppenzeit von *Manduca sexta*. Meßwerte ($n \geq 5$) $\pm$ S.E.M.

●, ▲ Larven und weibliche Puppen ; ○, △ männliche Puppen.

4.1.7. Sauerstoffverbrauch, Kohlendioxidproduktion und Respiratorische Quotienten

Während der Häutung vom 4. zum 5. Larvenstadium nahmen die Tiere mit etwa 0.6 ml/h (3. Tag, L 4) nur halb soviel Sauerstoff wie am Tag zuvor auf ($p < 0.001$; Abb. 18). Während der Freßphase des 5. Stadiums nahm die Atmung bis zum 3. Tag stark zu und erreichte Werte von 7 ml O_2 /h; auch am folgenden Tag wurde dieser Verbrauch gefunden. Die täglichen Zuwachsraten bis zum 3. Tag (L 5) konnten jeweils statistisch gesichert werden ($p < 0.001$). Bis zum 3. Tag nach der Puppenhäutung wurde die Atmung auf etwa 0.5 ml O_2 /h reduziert. Einen Tag vor der Puppenhäutung wurde die Atmung nochmals signifikant gegenüber den benachbarten Tagen erhöht (Tag 9; $p < 0.001$). Geschlechtsspezifische Unterschiede konnten nur am 1. Tag der Puppenzeit auf dem 5-Prozent-Niveau gefunden werden.

Am 3. Tag des 4. Larvenstadiums nahmen die Tiere mit $0.5 \text{ ml} \times \text{h}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ nur halb soviel Sauerstoff wie am Tag zuvor auf (Abb. 19). Am 1. und 2. Tag des 5. Larvenstadiums wurde mit 1.4 ml/h ein Maximum erreicht. Im Laufe der Freßphase des Stadiums wurde der Sauerstoffverbrauch pro Gramm Körpergewicht reduziert, dagegen strebte der Sauerstoffgesamtverbrauch einem Maximum zu (3. und 4. Tag; Abb. 18). Auch während der Pharatepuppenzeit ging der Sauerstoffverbrauch pro Gramm Körpergewicht zurück und erreichte in der Puppenzeit Werte unter $0.2 \text{ ml } O_2 \times \text{h}^{-1} \times \text{g}^{-1}$. Wiederum wurde kurz vor der Puppenhäutung (Tag 9) ein erhöhter Verbrauch gefunden.

Die stündlichen Kohlendioxidproduktionen der Tiere (Abb. 20) und pro Gramm Körpergewicht (Abb. 21) folgten im zeitlichen Verlauf den entsprechenden Kurven für den Sauerstoffverbrauch (Abb. 18 und 19), doch lagen die entsprechenden Absolutwerte meist niedriger. Während der Puppenzeit war die Kohlendioxidproduktion zum Teil größer als der Sauerstoffverbrauch.

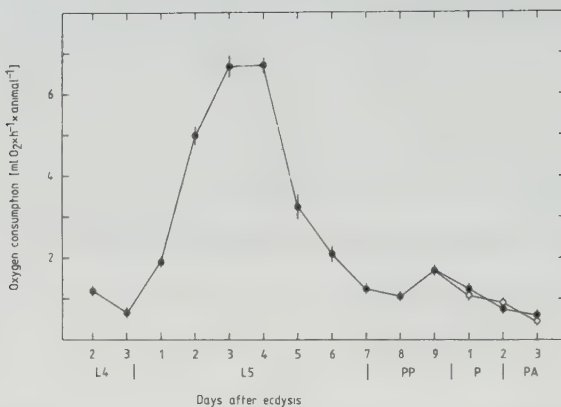


Abb. 18 : Sauerstoffverbrauch von *Manduca sexta* während der späten Larval- und frühen Puppenzeit. Meßwerte ($n \geq 5$) $\pm$ S.E.M. ● Larven und weibliche Puppen ; ○ männliche Puppen.

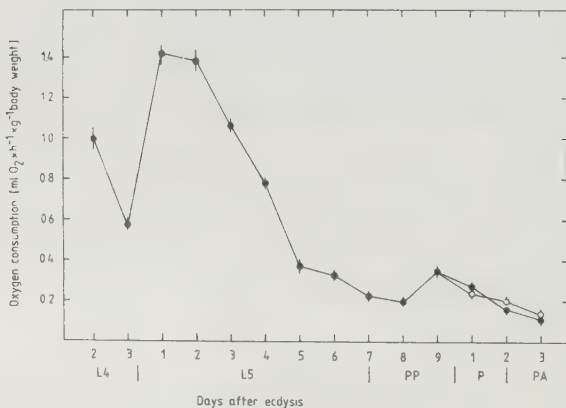


Abb. 19 : Sauerstoffverbrauch bezogen auf ein Gramm Körpergewicht während der späten Larval- und frühen Puppenzeit von *Manduca sexta*. Meßwerte ($n \geq 5$) $\pm$ S.E.M. ● Larven und weibliche Puppen ; ○ männliche Puppen.

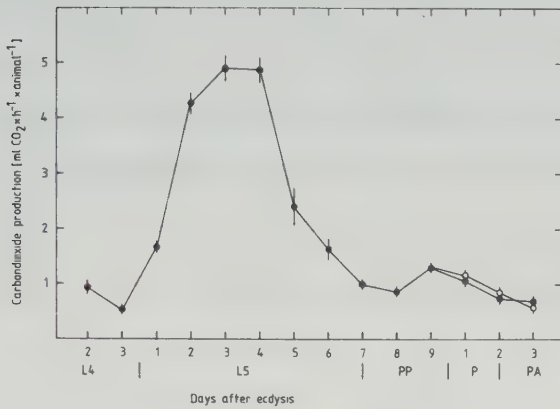


Abb. 20 : Kohlendioxidproduktion von *Manduca sexta* während der späten Larval- und frühen Puppenzeit. Meßwerte ($n \geq 5$) $\pm$ S.E.M. ● Larven und weibliche Puppen ; ○ männliche Puppen.

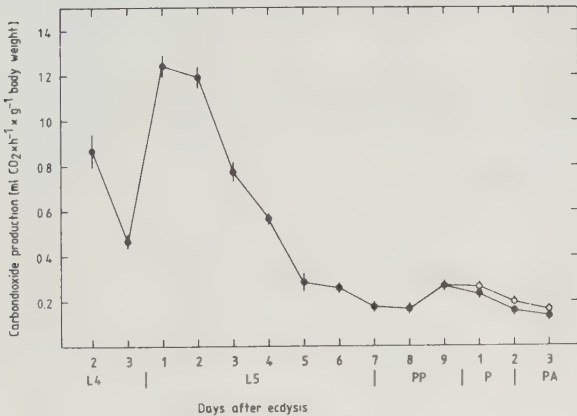


Abb. 21 : Kohlendioxidproduktion bezogen auf ein Gramm Körpergewicht während der späten Larval- und frühen Puppenzeit von *Manduca sexta*. Meßwerte ($n \geq 5$) $\pm$ S.E.M. ● Larven und weibliche Puppen ; ○ männliche Puppen.

Im Laufe des 5. Larvenstadiums lagen die Respiratorischen Quotienten (RQ) zwischen 0.7 und 0.9 (Tab. 1). Am Anfang des Stadiums betrugen die Quotienten zwischen 0.8 und 0.9, während in der Folgezeit meist Werte zwischen 0.7 und 0.8 gefunden wurden. Erst im Laufe der Puppenzeit näherten sich die Respiratorischen Quotienten dem Wert 1 und überstiegen ihn. Die RQ-Werte betrugen nie 0.7, nur einmal annähernd 1.0 (2. Tag der Puppenzeit, Weibchen). Das bedeutet, daß wohl während des größten Teils des Beobachtungszeitraums Kohlenhydrate und Lipide gleichzeitig oxidiert werden.

Tag	Stadium	RQ
2. Tag	L 4	0.828 $\pm$ 0.044
3. Tag	L 4	0.844 $\pm$ 0.045
	E	
1. Tag	L 5	0.871 $\pm$ 0.012
2. Tag	L 5	0.864 $\pm$ 0.019
3. Tag	L 5	0.731 $\pm$ 0.022
4. Tag	L 5	0.721 $\pm$ 0.018
5. Tag	L 5	0.731 $\pm$ 0.038
6. Tag	L 5	0.778 $\pm$ 0.025
7. Tag	L 5	0.789 $\pm$ 0.021
8. Tag	L 5	0.814 $\pm$ 0.013
9. Tag	L 5	0.767 $\pm$ 0.020
	E	
1. Tag	P ♀	0.877 $\pm$ 0.033
1. Tag	P ♂	0.987 $\pm$ 0.036
2. Tag	PA ♀	1.018 $\pm$ 0.013
2. Tag	PA ♂	0.972 $\pm$ 0.028
3. Tag	PA ♀	1.218 $\pm$ 0.029
3. Tag	PA ♂	1.186 $\pm$ 0.053

Tab. 1 : Respiratorische Quotienten während der späten Larval - und frühen Puppenzeit von *Manduca sexta*. Meßwerte ($n \geq 5$) $\pm$ S.E.M.

4.2. Untersuchungen an hungernden Larven von *Manduca sexta*

Während der Larvalentwicklung von Insekten treten Häutungen auf; während dieser Phasen können die Tiere keine Nahrung aufnehmen. Deshalb wurden Untersuchungen mit hungernden Larven des 5. Stadiums von *Manduca sexta* durchgeführt.

4.2.1. Veränderungen des Körpergewichts, des Hämolympfvolumens und des Fettkörpertrockengewichts

Bei Hungertieren nahmen Körpergewichte, Hämolympfvolumina und Fettkörpertrockengewichte kontinuierlich ab, während in den Kontrolltieren diese Größen zunahmen.

Das Ausgangskörpergewicht der Versuchstiere betrug etwa 6.4 g (Abb. 22). Nach 48 stündigem Hunger waren die Gewichte der Larven auf etwas mehr als 5 g zurückgegangen; die Kontrolltiere erreichten im Durchschnitt mehr als 9 g.

Am Beginn der Hungerphase betrug das Hämolympfvolumen der Larven etwa 1.9 ml (Abb. 23); in den Kontrolltieren nahm dieser Wert um etwa 50 % auf mehr als 3 ml (48 h) zu. In den hungernden Larven ging das Hämolympfvolumen kontinuierlich zurück; nach 48 h wurden etwa 1.6 ml erreicht, was 85 % des Ausgangswertes entspricht. Bereits nach 3 bzw. 6 h Hunger waren die Meßwerte auf dem 2- bzw. 5-Prozent-Niveau signifikant von den Kontrollen verschieden.

Während des betrachteten Zeitraumes betrug der prozentuale Anteil des Hämolympfvolumens am Körpergewicht sowohl in den Hunger- als auch in den Kontrolltieren zwischen 30 und 35 %; er war also nur geringen Veränderungen unterworfen.

Am Anfang der Hungerperiode betrug das Fettkörpertrockengewicht etwa 200 mg (Abb. 24). Es nahm in der Folgezeit auf etwa 130 mg ab (48 h). In den

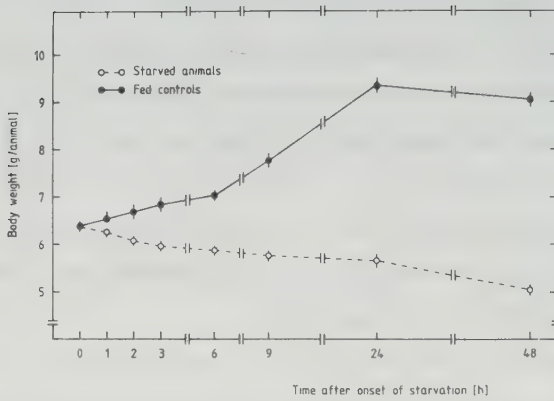


Abb. 22 : Körpergewichte von *Manduca sexta* während einer Hungerphase. Das Experiment wurde am 3. Tag des 5. Larvenstadiums zwischen 9 und 10 Uhr begonnen. Meßwerte ($n = 10$) $\pm$ Standardabweichung.

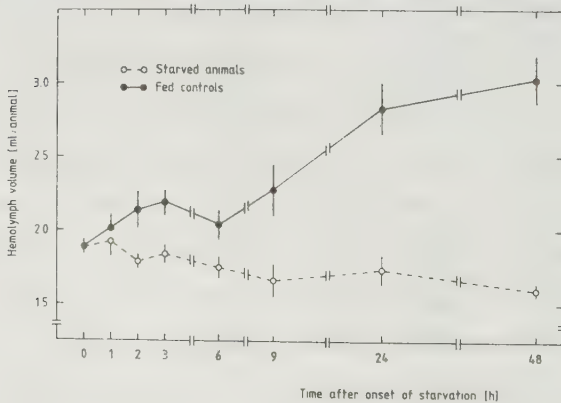


Abb. 23 : Hämolympfvolumina von *Manduca sexta* während einer Hungerphase. Das Experiment wurde am 3. Tag des 5. Larvenstadiums zwischen 9 und 10 Uhr begonnen. Meßwerte ($n \geq 5$) $\pm$ S.E.M.

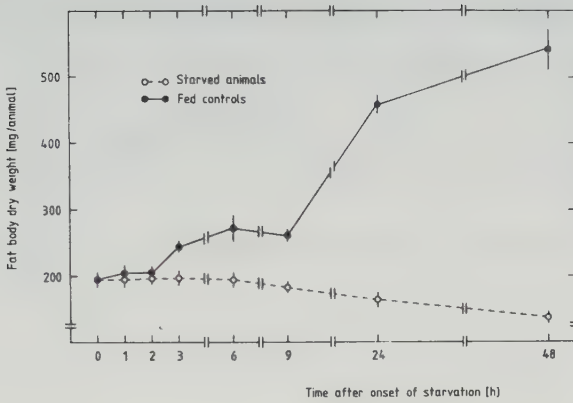


Abb. 24 : Fettkörpertrockengewichte während einer Hungerphase von *Manduca sexta*. Das Experiment wurde am 3. Tag des 5. Larvenstadiums zwischen 9 und 10 Uhr begonnen. Meßwerte ($n \geq 5$) $\pm$ S.E.M.

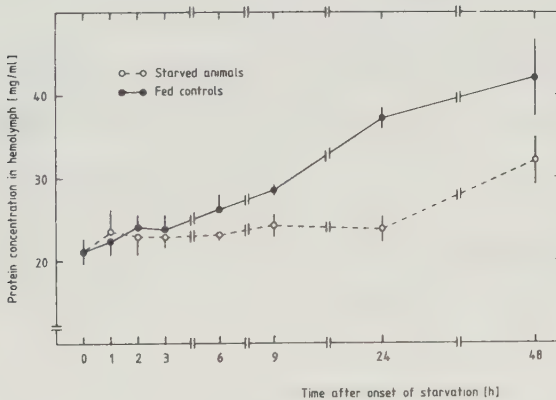


Abb. 25 : Proteinkonzentration der Hämolymphe während einer Hungerphase von *Manduca sexta*. Das Experiment wurde am 3. Tag des 5. Larvenstadiums zwischen 9 und 10 Uhr begonnen. Meßwerte ($n \geq 5$) $\pm$ S.E.M.

Kontrollen wurde nach 48 h mit 500 mg pro Tier ein mehr als dreimal so hoher Wert gefunden. Bereits nach 3 h lagen die gefütterten Kontrollen signifikant über den Werten der hungernden Tiere ($p < 0.01$).

4.2.2. Veränderungen der Proteinmengen in Hämolymphe und Fettkörper

In den Kontrolltieren nahm die Proteinkonzentration der Hämolymphe im Laufe des betrachteten Zeitraumes von mehr als 20 mg/ml (0 h) auf fast 45 mg/ml zu ($p < 0.01$; Abb. 25). Während der ersten 24 h der Hungerperiode blieb die Proteinkonzentration fast unverändert, stieg dann jedoch auf mehr als 30 mg/ml an (48 h; $p < 0.01$).

In den ersten 24 h der Hungerperiode betrug die Gesamtmenge der Hämolympheproteine 40 mg, erreichte nach insgesamt 48 h 50 mg (Abb. 26). In den Kontrolltieren nahm die Hämolympheproteinmenge kontinuierlich um mehr als das Dreifache auf 130 mg (48 h) zu.

Der Proteingehalt des Fettkörpers lag sowohl in gehungerten als auch in gefütterten Tieren während der ersten 9 h des Versuches zwischen 100 und 120 $\mu\text{g}/\text{mg}$ gefriergetrocknetem Fettkörper (Abb. 27). In der Folgezeit nahmen die Werte in beiden Versuchsgruppen ab und erreichten in den Hungertieren nach 48 h etwa 80 $\mu\text{g}/\text{mg}$; in gefütterten Kontrollen lagen die Meßwerte etwa 10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ niedriger als in den Hungertieren.

In den Kontrolltieren stieg die Gesamtmenge der Proteine im Fettkörper kontinuierlich von etwa 20 auf 40 mg an, während in den Hungertieren nach 48 h nur noch 10 mg Protein pro Fettkörper nachgewiesen werden konnten (Abb. 27).

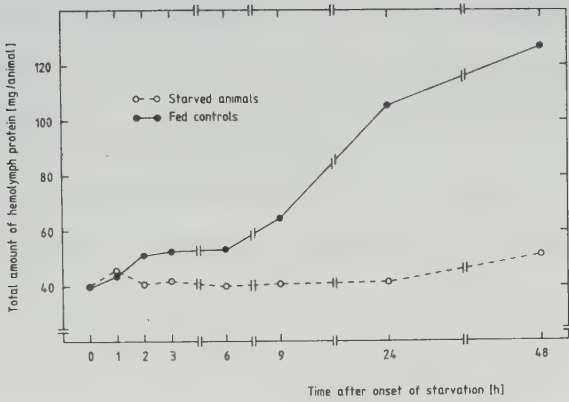


Abb. 26 : Gesamtmengen der Hämolympheproteine während einer Hungerphase von *Manduca sexta*. Das Experiment wurde am 3. Tag des 5. Larvenstadiums zwischen 9 und 10 Uhr begonnen.

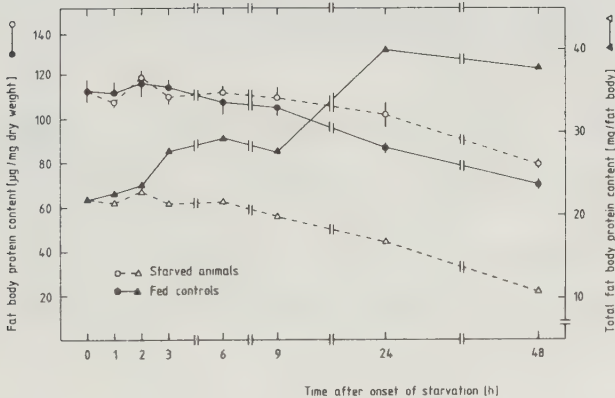


Abb. 27 : Proteingehalt des gefriergetrockneten Fettkörpers während einer Hungerphase von *Manduca sexta*. Das Experiment wurde am 3. Tag des 5. Larvenstadiums zwischen 9 und 10 Uhr begonnen. Meßwerte ($n \geq 5$) $\pm$ S.E.M.

4.2.3. Aktivitäten der Fettkörperglykogenphosphorylase

In den gefütterten Kontrolltieren blieben während der ersten 24 h etwa 10 % der Glykogenphosphorylase in der aktiven Form (Abb. 28). Nachdem die Tiere in die Wanderphase eingetreten waren, wurden etwa 20 % aktive Form nachgewiesen ($p < 0.05$). In den Hungertieren war der Prozentsatz nach 1 h nur geringfügig erhöht ($p < 0.1$). Nach 2 bzw. 3 h wurde eine deutliche Aktivierung auf 40 ($p < 0.01$) bzw. 52 % ($p < 0.001$) festgestellt. In der Folgezeit ging die Aktivität langsam zurück, erreichte nach 24 h 20 % und nach 48 h 7.5 %. Nach 48 h wurde also in den hungernden Larven ein signifikant niedrigerer Wert ($p < 0.01$) als in den Kontrollen gefunden.

Die spezifischen Aktivitäten der aktiven Glykogenphosphorylase blieben in den Kontrollen für etwa 24 h unter 10 U/mg und erreichten nach insgesamt 48 h 15 U/mg (Abb. 29). In hungernden Larven stieg die spezifische Aktivität innerhalb von 3 h recht schnell auf fast 40 U/mg. Von der 6. bis zur 24. Stunde wurde ein Plateau von etwa 20 bis 25 U/mg gehalten. Nach 48 stündigem Hunger konnten nur noch 10 U/mg nachgewiesen werden.

Innerhalb der ersten 3 h der Hungerperiode stieg die Gesamtmenge der aktiven Glykogenphosphorylase von etwa 100 auf 800 U/Fettkörper (Abb. 30). Anschließend ging diese Aktivität wieder langsam auf 100 U pro Fettkörper (48 h) zurück. In den gefütterten Kontrolltieren wurden während der ersten 24 h weniger als 250 U/Fettkörper festgestellt. Über 500 U befanden sich nach insgesamt 48 h (Wandernde Larven) in der aktiven Form.

In den gefütterten Kontrolltieren veränderte sich die spezifische Aktivität der Gesamtform der Fettkörperglykogenphosphorylase nur wenig, die Meßwerte lagen zwischen 70 und 80 U/mg (Abb. 31). In den gehungerten Tieren lagen die spezifischen Aktivitäten während der ersten 9 h nur wenig über den Kontrollen. Danach stiegen die Meßwerte auf über 100 U/mg an und erreichten nach 48 h Hun-

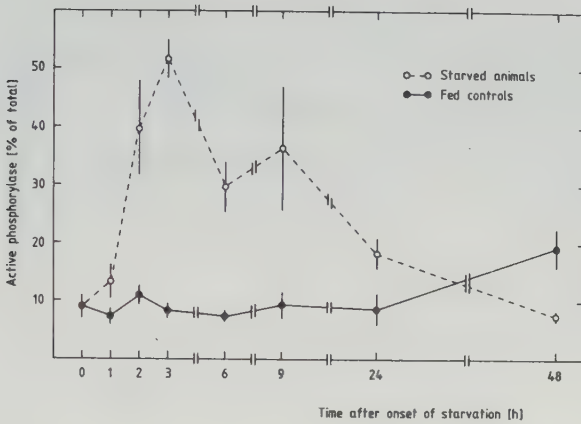


Abb. 28 : Prozentuale Anteile der aktiven Form an der Gesamtaktivität der Fettkörperglykogenphosphorylase während einer Hungerphase von *Manduca sexta*. Das Experiment wurde am 3. Tag des 5. Larvenstadiums zwischen 9 und 10 Uhr begonnen. Meßwerte ($n \geq 5$) $\pm$ S.E.M.

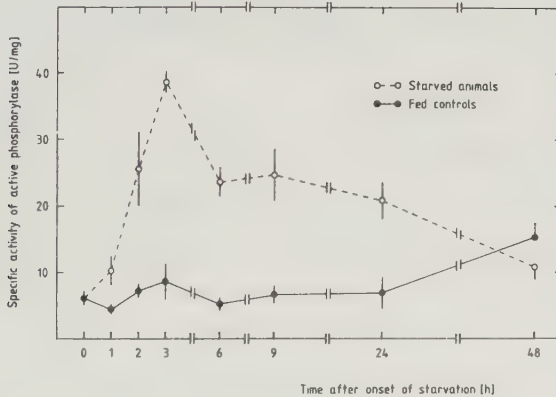


Abb. 29 : Spezifische Aktivitäten der aktiven Form der Fettkörperglykogenphosphorylase während einer Hungerphase von *Manduca sexta*. Das Experiment wurde am 3. Tag des 5. Larvenstadiums zwischen 9 und 10 Uhr begonnen. Meßwerte ($n \leq 5$) $\pm$ S.E.M.

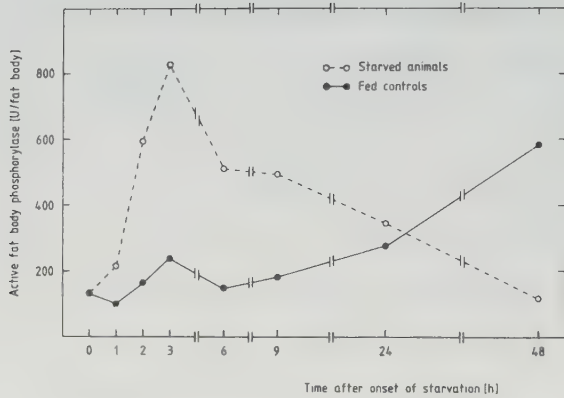


Abb. 30 : Gesamtmenge der aktiven Form der Fettkörperglykogenphosphorylase während einer Hungerphase von *Manduca sexta*. Das Experiment wurde am 3. Tag des 5. Larvenstadium zwischen 9 und 10 Uhr begonnen.

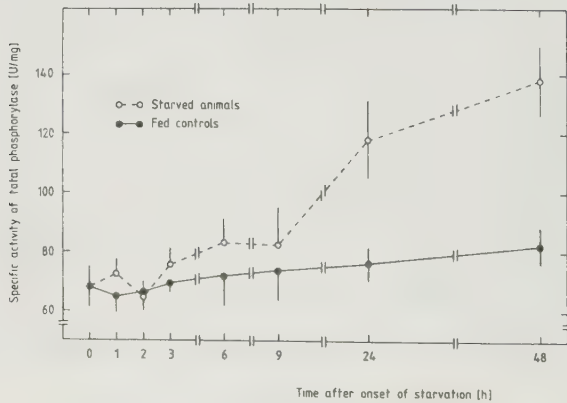


Abb. 31 : Spezifische Aktivitäten der Gesamtform der Fettkörperglykogenphosphorylase während einer Hungerphase von *Manduca sexta*. Das Experiment wurde am 3. Tag des 5. Larvenstadiums zwischen 9 und 10 Uhr begonnen. Meßwerte ($n \geq 5$) $\pm$ S.E.M.

ger etwa 135 U/mg ($p < 0.01$).

In den gefütterten Kontrolltieren stieg die Gesamtmenge der Fettkörperglykogenphosphorylaseaktivität von 1500 U (0 h) auf etwa 3000 U pro Fettkörper (48 h) (Abb. 32). In den hungernden Tieren wurden während des gesamten betrachteten Zeitraumes Werte zwischen 1500 und 2000 U pro Fettkörper gefunden.

4.2.4. Kohlenhydratmengen in Fettkörper, Hämolymphe und Kutikula

In hungernden Larven nahmen auch die Kohlenhydratmengen in Fettkörper und Hämolymphe ab.

Am Beginn der Hungerphase betrug der Glykogengehalt des gefriergetrockneten Fettkörpers mehr als 150 $\mu\text{g/mg}$ (Abb. 33) und nahm innerhalb von 24 h auf etwa 80 $\mu\text{g/mg}$ ab ($p < 0.02$); auf diesem Wert blieb er für weitere 24 h. In den Kontrolltieren wurde der Glykogengehalt des Fettkörpers kontinuierlich auf über 250 $\mu\text{g/mg}$ (24 h) erhöht; nach weiteren 24 h waren noch 225 $\mu\text{g/mg}$ vorhanden.

Am Beginn der Hungerperiode waren etwa 30 mg Glykogen im Fettkörper vorhanden. Während in den Kontrolltieren dieser Wert auf etwa 120 mg (24 bzw. 48 h) anstieg (Abb. 34), ging er in Hungertieren auf etwa 10 mg (24 bzw. 48 h) zurück.

In gefütterten Larven betrug die Trehalosekonzentration der Hämolymphe durchschnittlich zwischen 11.5 und 14 mg/ml (Abb. 35). Die Konzentrationen in den gehungerten Tieren lagen mit Werten zwischen 12.5 und 16 mg/ml fast stets über den Kontrollen, doch waren nur nach 9 h signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) zwischen Kontrollen und Hungertieren nachzuweisen.

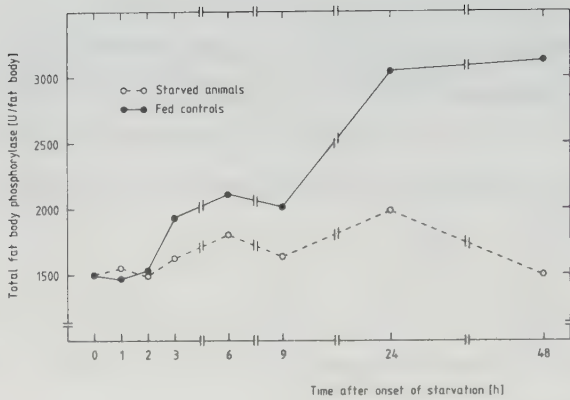


Abb. 32 : Gesamtmenge der Fettkörperglykogenphosphorylase während einer Hungerphase von *Manduca sexta*. Das Experiment wurde am 3. Tag des 5. Larvenstadiums zwischen 9 und 10 Uhr begonnen.

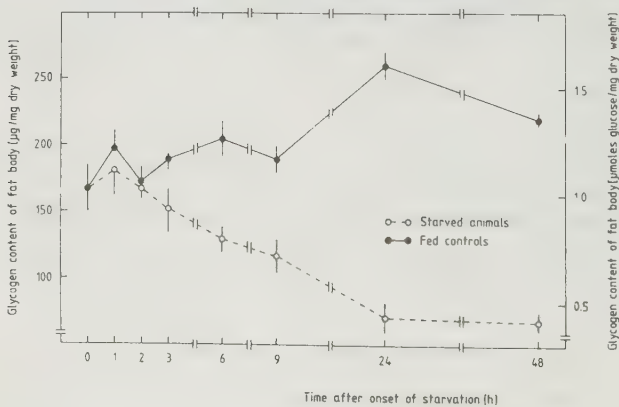


Abb. 33 : Glykogengehalt des gefriergetrockneten Fettkörpers während einer Hungerphase von *Manduca sexta*. Das Experiment wurde am 3. Tag des 5. Larvenstadiums zwischen 9 und 10 Uhr begonnen. Meßwerte ($n \geq 5$) $\pm$ S.E.M.

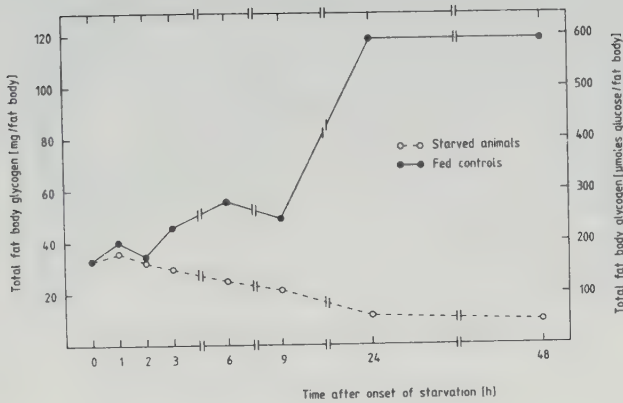


Abb. 34 : Gesamtmenge des Fettkörperglykogens während einer Hungerphase von *Manduca sexta*. Das Experiment wurde am 3. Tag des 5. Larvenstadiums zwischen 9 und 10 Uhr begonnen.

Die Hämolymphe von Kontrolltieren enthielt während des gesamten Versuchs mehr Trehalose als die der Hungertiere (Abb. 36). In den Kontrollen stieg die Trehalosemenge von etwa 25 mg auf etwas mehr als 40 mg. Während der ersten 24 h der Hungerphase veränderte sich die Trehalosemenge in der Hämolymphe nur geringfügig und betrug nach insgesamt 48 h etwa 20 mg.

In den Kontrolltieren lag die Glucosekonzentration der Hämolymphe im Durchschnitt stets über 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und erreichte Maximalwerte von etwa 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Abb. 37). Im Gegensatz dazu fiel die Glucosekonzentration in den Hungertieren. Bereits nach 3 h war ein signifikanter Unterschied gegen den Ausgangswert ($p < 0.01$) und die entsprechende Kontrolle ($p < 0.001$) festzustellen. Nach 6 h Hunger wurde ein Niveau von etwa 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ erreicht.

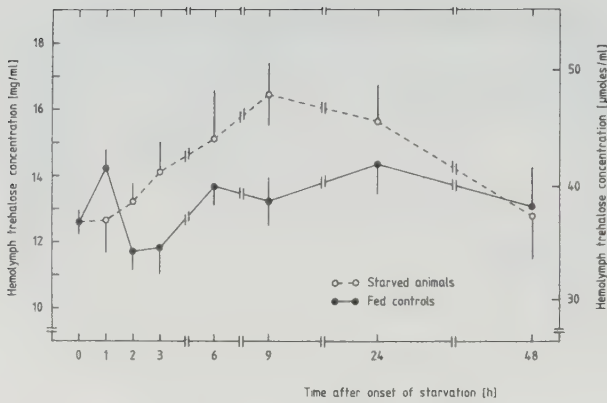


Abb. 35 : Trehalosekonzentration der Hämolymphe während einer Hungerphase von *Manduca sexta*. Das Experiment wurde am 3. Tag des 5. Larvenstadiums zwischen 9 und 10 Uhr begonnen. Meßwerte ($n \geq 5$) $\pm$ S.E.M.

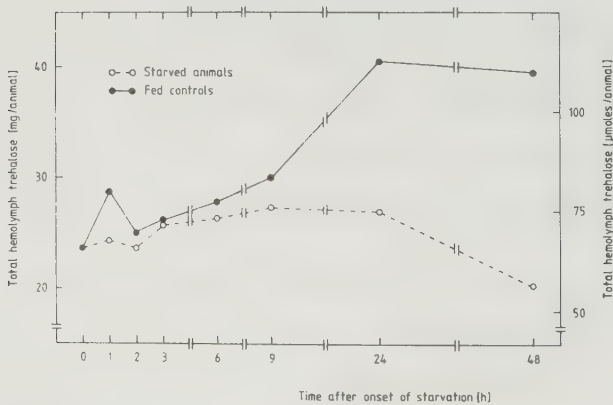


Abb. 36 : Gesamtmenge der Trehalose in der Hämolymphe von *Manduca sexta* während einer Hungerphase. Das Experiment wurde am 3. Tag des 5. Larvenstadiums zwischen 9 und 10 Uhr begonnen.

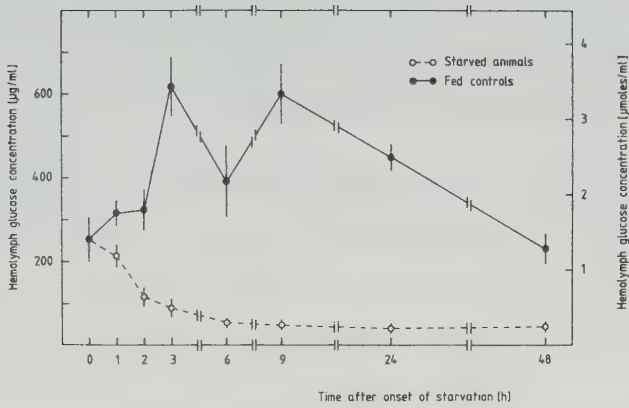


Abb. 37 : Glucosekonzentration der Hämolymphe während einer Hungerphase von *Manduca sexta*. Das Experiment wurde am 3. Tag des 5. Larvenstadiums zwischen 9 und 10 Uhr begonnen. Meßwerte ($n \geq 5$) $\pm$ S.E.M.

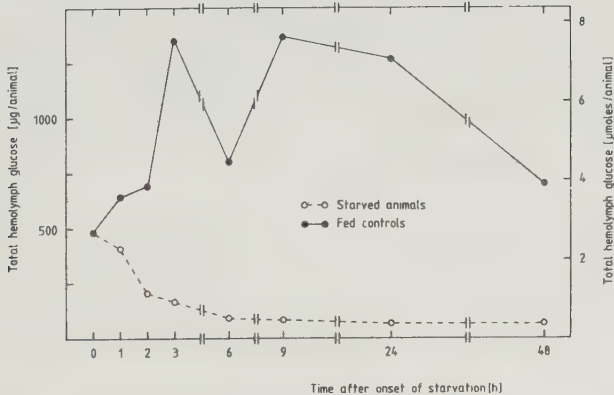


Abb. 38 : Gesamtmenge der Glucose in der Hämolymphe von *Manduca sexta* während einer Hungerphase. Das Experiment wurde am 3. Tag des 5. Larvenstadiums zwischen 9 und 10 Uhr begonnen.

An Beginn des Experiments waren etwa 500 μg Glucose in der Hämolymphe der Tiere vorhanden (Abb. 38). In den gefütterten Kontrolltieren lag die Glucosemenge stets über diesem Wert, in den gehungerten Larven ging er jedoch zurück; nach 6 h wurden weniger als 100 μg gefunden.

In den Kontrolltieren blieb die Konzentration der intrazellulären Zucker mit etwa 10 μg Glucoseäquivalenten/mg gefriergetrocknetem Fettkörper fast unverändert (Abb. 39). In den Hungertieren stieg die Konzentration an und war nach 3,9 und 24 h sogar signifikant erhöht ($p < 0.01$). Werte von etwa 15 $\mu\text{g}/\text{mg}$ wurden in dieser Zeit gefunden. Erst nach insgesamt 48 h wurde mit etwa 8 $\mu\text{g}/\text{mg}$ ein niedrigerer Wert als in den Kontrollen erreicht.

Während der ersten 9 h des Versuchs waren in den Fettkörpern von Versuchs- und Kontrolltieren mit 2 bis 3 mg Glucoseäquivalenten fast gleiche Mengen intrazellulärer Zucker vorhanden (Abb. 40). Erst danach lagen die gefütterten Kontrollen deutlich über den Hungertieren. Die Kontrollen verdreifachten innerhalb des betrachteten Zeitraumes die Menge der intrazellulären Zucker. In den Hungertieren stieg die Menge der intrazellulären Zucker des Fettkörpers zunächst leicht an, betrug jedoch nach insgesamt 48 h mit etwa 1.5 mg nur die Hälfte des Ausgangswertes.

Zu Beginn des Versuchs lagen in der Kutikula der Larven etwa 65 mg Chitosan vor (Abb. 41). Dieser Wert stieg in der Folgezeit sowohl in den Hungertieren als auch in den Kontrollen langsam an; nach 9 h konnten 80 mg pro Tier nachgewiesen werden. Dieser Wert unterschied sich signifikant vom Ausgangswert ($p < 0.001$). Erst nach insgesamt 24 h war in den Kontrollen mit durchschnittlich 103 mg deutlich mehr Chitosan als in den Hungertieren vorhanden (85 mg; $p < 0.001$). Während die Hungertiere den Chitosangehalt nur noch unwesentlich veränderten, erhöhte er sich in den Kontrollen weiter auf 117 mg pro Tier ($p < 0.01$).

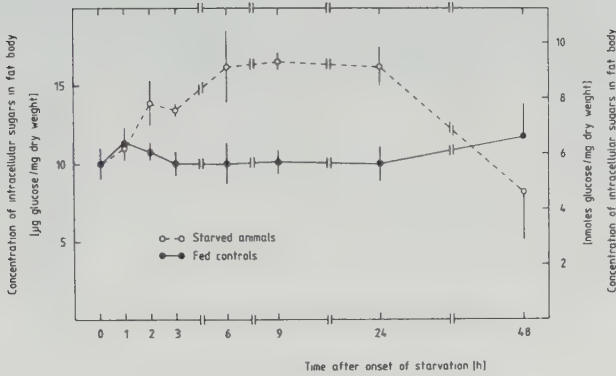


Abb. 39 : Konzentration der intrazellulären Zucker im gefriergetrockneten Fettkörper von *Manduca sexta* während einer Hungerphase. Das Experiment wurde am 3. Tag des 5. Larvenstadiums zwischen 9 und 10 Uhr begonnen. Meßwerte ($n \geq 5$) $\pm$ S.E.M.

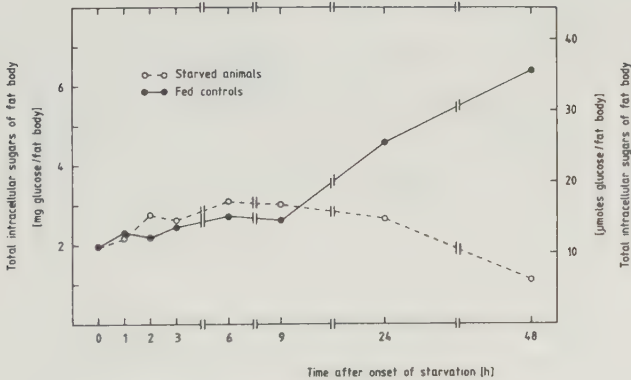


Abb. 40 : Gesamtmenge der intrazellulären Zucker im gefriergetrockneten Fettkörper von *Manduca sexta* während einer Hungerphase. Das Experiment wurde am 3. Tag des 5. Larvenstadiums zwischen 9 und 10 Uhr begonnen.

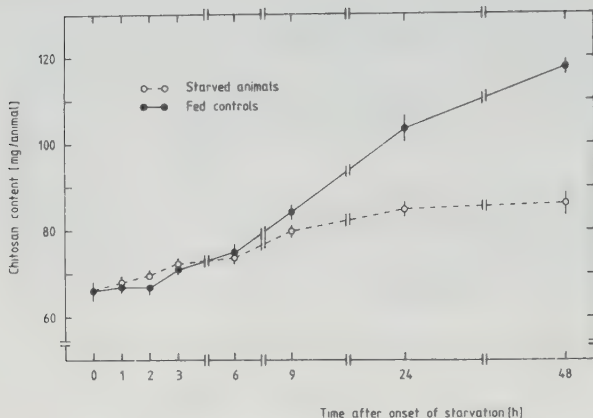


Abb. 41 : Chitosangehalt der Kutikula von *Manduca sexta* während einer Hungerphase. Das Experiment wurde am 3. Tag des 5. Larvenstadiums zwischen 9 und 10 Uhr begonnen. Meßwerte ($n \geq 5$) $\pm$ S.E.M.

4.2.5. Lipidmengen in Hämolymphe und Fettkörper

Interessant sind die Ergebnisse, die für die Lipidmengen in Hämolymphe und Fettkörper von Hungertieren gefunden wurden; sie zeigen, daß die Lipide in beiden Organen während der ersten 24 h des Hungerns nur geringfügig abnahmen. Erst in den folgenden 24 h wurde ein deutlicher Rückgang der Lipidmengen des Fettkörpers festgestellt.

Während der ersten 6 h des Versuchs betrug die Hämolymphlipidkonzentration in Hunger- und Kontrolltieren etwa 1.5 mg/ml (Abb. 42). Nach 9 h war der Wert in den Hungertieren unter 1 mg/ml gesunken und signifikant von Kontrolltieren und Ausgangswert verschieden ($p < 0.02$). Nach 48 h wurde zwar in den hungernden Tieren mit 2.8 mg/ml eine höhere Konzentration als in den gefütterten Larven (2.2 mg/ml) erreicht, doch war eine statistische Sicherung des Unterschieds nicht möglich.

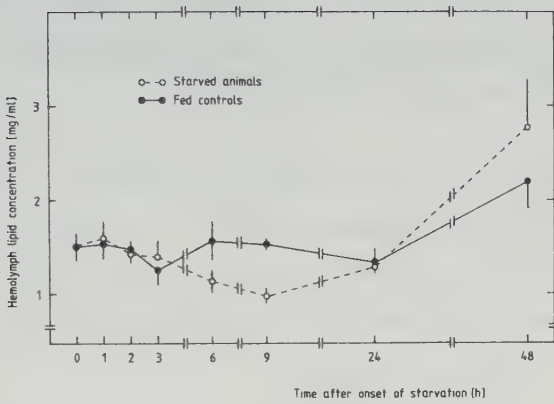


Abb. 42 : Konzentration der Lipide in der Hämolymphe von *Manduca sexta* während einer Hungerphase. Das Experiment wurde am 3. Tag des 5. Larvenstadiums zwischen 9 und 10 Uhr begonnen. Meßwerte ($n \geq 5$) $\pm$ S.E.M.

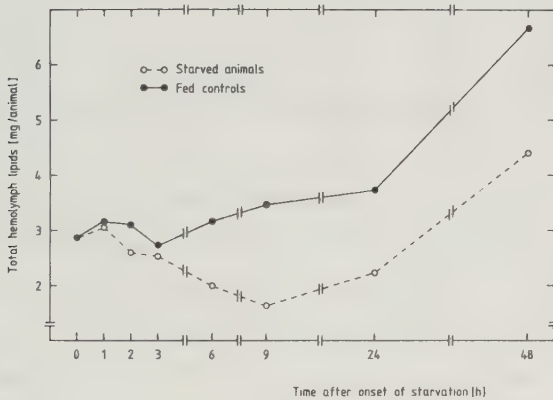


Abb. 43 : Gesamtmenge der Lipide in der Hämolymphe von *Manduca sexta* während einer Hungerphase. Das Experiment wurde am 3. Tag des 5. Larvenstadiums zwischen 9 und 10 Uhr begonnen.

In den Kontrolltieren lag die Gesamtmenge der Hämolyphlipide während der ersten 24 h zwischen 3 und 4 mg, stieg dann aber auf mehr als 6 mg (48 h) an (Abb. 43). In den Hungertieren sank die Hämolyphlipidmenge nach 9 h auf 1.7 mg und stieg in der Folgezeit auf 4.4 mg (48 h) an.

In den Kontrollen blieb der Lipidgehalt des Fettkörpers mit Werten zwischen 550 und 600 $\mu\text{g}/\text{mg}$ sehr konstant (Abb. 44). In den Hungertieren wurde nach 24 bzw. 48 h 650 bis 700 $\mu\text{g}/\text{mg}$ erreicht. Bereits nach 9 h lagen die Werte der Hungertiere signifikant höher als zu Versuchsbeginn ($p < 0.02$) und in den entsprechenden Kontrolltieren ($p < 0.002$).

Innerhalb des betrachteten Zeitraumes verdreifachten die gefütterten Larven die Lipidgesamtmenge des Fettkörpers von 110 auf etwa 300 mg (Abb. 45). In den Hungertieren blieb der Lipidgehalt mit etwa 110 mg pro Fettkörper innerhalb der ersten 24 h recht konstant. Erst nach insgesamt 48 h war mit 90 mg ein niedrigerer Wert festzustellen.

4.2.6. Sauerstoffverbrauch, Kohlendioxidproduktion und Respiratorische Quotienten

Während der ersten 24 h des Versuchs blieb der Sauerstoffverbrauch der gefütterten Tiere mit Werten zwischen 6 und 7 $\text{ml Sauerstoff} \times \text{h}^{-1} \times \text{Tier}^{-1}$ annähernd konstant (Abb. 46), fiel jedoch anschließend auf etwas mehr als 4 ml ab (48 h; $p < 0.001$). In den Hungertieren war bereits nach 1 h ein deutlicher Unterschied zu den Kontrollen zu verzeichnen ($p < 0.002$). Dieser Unterschied vergrößerte sich weiter, denn nach 24 h Hunger verbrauchten die Larven etwa 2.5 $\text{ml O}_2 \times \text{h}^{-1}$ (Kontrolltiere ca. 7 $\text{ml O}_2 \times \text{h}^{-1}$; $p < 0.001$). Innerhalb der folgenden 24 h war in den Hungertieren ein leichtes, aber signifikantes Ansteigen festzustellen.

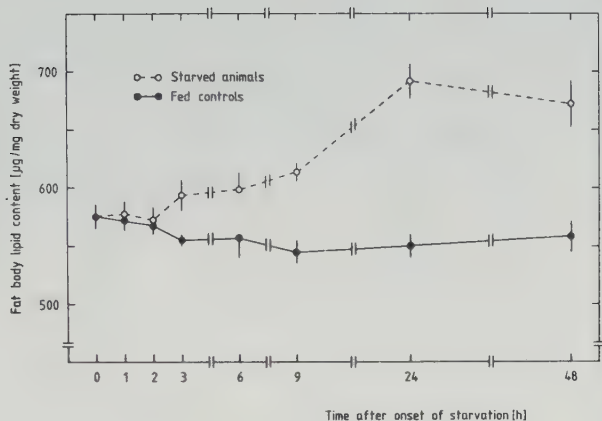


Abb. 44 : Lipidgehalt des gefriergetrockneten Fettkörpers von *Manduca sexta* während einer Hungerphase. Das Experiment wurde am 3. Tag des 5. Larvenstadiums zwischen 9 und 10 Uhr begonnen. Meßwerte ($n \approx 5$) $\pm$ S.E.M.

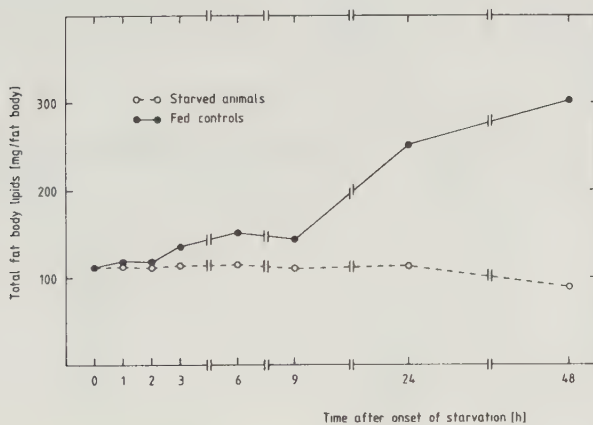


Abb. 45 : Gesamtmenge der Fettkörperlipide während einer Hungerphase von *Manduca sexta*. Das Experiment wurde am 3. Tag des 5. Larvenstadiums zwischen 9 und 10 Uhr begonnen.

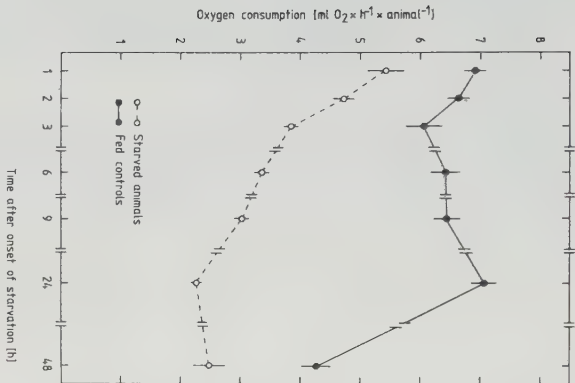


Abb. 46 : Sauerstoffverbrauch von *Manduca sexta* während einer Hungerphase. Das Experiment wurde am 3. Tag des 5. Larvenstadiums zwischen 9 und 10 Uhr begonnen. Meßwerte ($n \geq 5$) $\pm$ S.E.M.

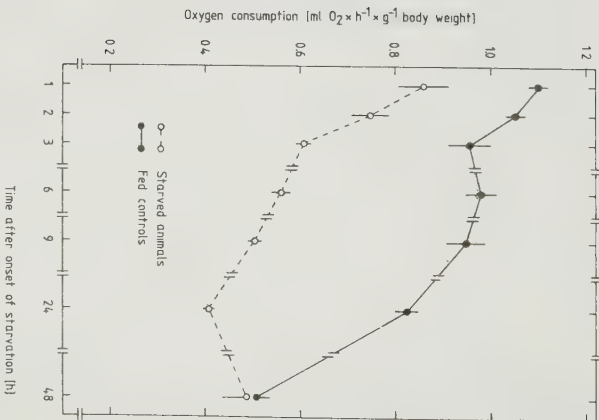


Abb. 47 : Sauerstoffverbrauch bezogen auf 1 Gramm Körpergewicht während einer Hungerphase von *Manduca sexta*. Das Experiment wurde am 3. Tag des 5. Larvenstadiums zwischen 9 und 10 Uhr begonnen. Meßwerte ($n \geq 5$) $\pm$ S.E.M.

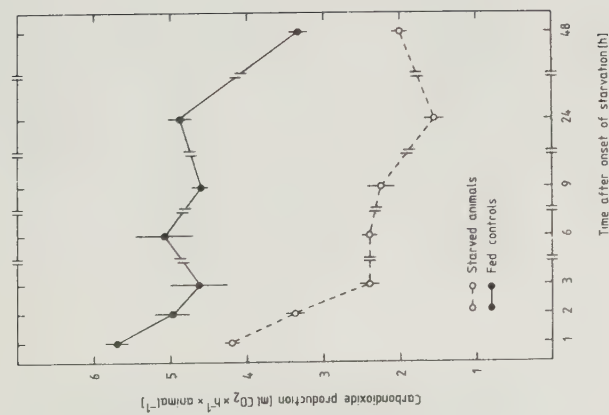


Abb. 48 : Kohlendioxidproduktion von *Manduca sexta* während einer Hungerphase. Das Experiment wurde am 3. Tag des 5. Larvenstadiums zwischen 9 und 10 Uhr begonnen. Meßwerte ($n \geq 5$) $\pm$ S.E.M.

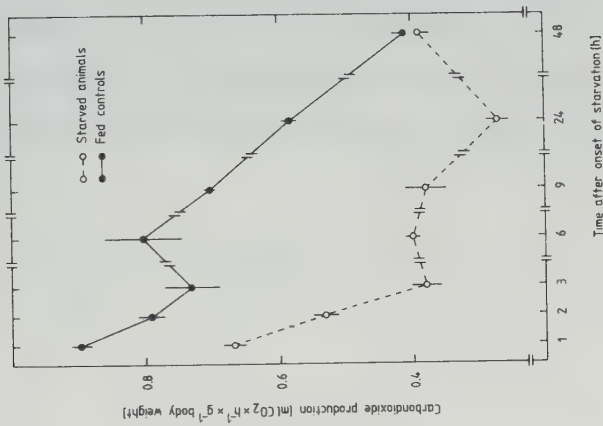


Abb. 49 : Kohlendioxidproduktion bezogen auf 1 Gramm Körpergewicht während einer Hungerphase von *Manduca sexta*. Das Experiment wurde am 3. Tag des 5. Larvenstadiums zwischen 9 und 10 Uhr begonnen. Meßwerte ($n \geq 5$) $\pm$ S.E.M.

Der Sauerstoffverbrauch der gefütterten Kontrollen nahm im betrachteten Zeitraum bezogen auf das Körpergewicht recht kontinuierlich ab (Abb. 47). Zu Beginn des Versuchs wurde ein Verbrauch von $1.1 \text{ ml O}_2 \times \text{h}^{-1} \times \text{g}^{-1}$ gemessen, nach 48 h war der Verbrauch auf die Hälfte zurückgegangen ($p < 0.001$). In den hungernden Larven wurde ein ähnlicher Verlauf gefunden, doch lagen die Meßwerte um 20 bis 40 % unter den Kontrolltieren.

Die Kohlendioxidproduktion folgte im zeitlichen Kurvenverlauf dem Sauerstoffverbrauch, doch wurden 20 bis 40 % weniger Kohlendioxid abgegeben als Sauerstoff aufgenommen wurde (Abb. 48 und 49).

Die Respiratorischen Quotienten der hungernden Larven konnten nicht individuell bestimmt werden (s. 3.3.8.). Der Durchschnitt der Kohlendioxidproduktion für einen bestimmten Zeitpunkt der Hungerperiode wurde durch den Durchschnitt des entsprechenden Sauerstoffverbrauchs geteilt. Die so erhaltenen Werte sind in Tab. 2 zusammengefaßt.

Zeit	Gehungert	Gefüttert
1 h	0.78	0.82
2 h	0.71	0.75
3 h	0.62	0.77
6 h	0.71	0.79
9 h	0.74	0.71
24 h	0.64	0.69
48 h	0.81	0.78

Tab. 2 : Respiratorische Quotienten während einer Hungerphase von *Manduca sexta*. Das Experiment wurde am 3. Tag des 5. Larvenstadiums zwischen 9 und 10 Uhr begonnen.

Am Beginn der Hungerperiode lagen die Respiratorischen Quotienten etwa bei 0.8. Während in den hungernden Larven der RQ relativ schnell abnahm blieb er in den Kontrollen bei Werten von mehr als 0.75. Nach 9 h war auch der RQ der gefütterten Tiere abgesunken (0.71). Nach 24 h wurden in Hungertieren Werte von 0.64, nach 48 h in beiden Versuchsgruppen Werte von etwa 0.8 gefunden.

4.3. Untersuchungen zur Steuerung der Phosphorylaseaktivierung in hungernden Larven von *Manduca sexta*

4.3.1. Tetrodotoxin-Paralyse von hungernden Larven

In hungernden Larven von *Manduca sexta* wird die aktive Form der Fettkörperglykogenphosphorylase innerhalb von 3 h erhöht (Abb. 28). Da hungernde Larven körperlich aktiv sind - sie suchen Futter -, könnte diese körperliche Aktivität zur Aktivierung der Fettkörperglykogenphosphorylase führen. Um die Futtersuche bei hungernden Larven zu unterbinden, wurden diese Tiere mit Tetrodotoxin (TTX) paralytisiert (Abb. 50).

In mit TTX paralytisierten Tieren wurde die aktive Phosphorylase innerhalb von 3 h auf 42 % aktiviert. Unbehandelte und mit Zitratlösung injizierte hungernde Tiere aktivierten die Phosphorylase ebenfalls auf über 40 %; unbehandelte gefütterte Kontrollen wiesen weniger als 10 %, mit Zitratlösung injizierte gefütterte Larven 11 % aktive Form auf ($p < 0.001$).

Die Phosphorylase wird in hungernden Larven also nicht infolge von erhöhter körperlicher Aktivität stimuliert.

In geschnürten Abdomen wurde auch getestet, ob TTX selbst die Fettkörperglykogenphosphorylase direkt aktiviert. Zwei voneinander unabhängige Versuche sind in Tab. 3 dargestellt. Unbehandelte Kontrollen enthielten weniger als 15 % aktive Phosphorylase. Die Injektion von TTX ergab keine stärkere Aktivierung der Phosphorylase als Zitrat- (Tab. 3 A) oder Insektensalzlösungen (Tab. 3 B).

4.3.2. Verfütterung von Agar

Da in Hungertieren der Darm langsam geleert wird, besteht die Möglichkeit, daß in diesen Larven die schwächer werdende Dehnung des Darmes an der auftretenden Aktivierung der Fettkörperglykogenphosphorylase beteiligt ist. Um für einen gefüllten Darm zu sorgen wurde Agar (3 % in Bidest.) verfüttert; Agar ent-

A				
Unbehandelte Kontrollen	5	11.0 ± 2.4	85.4 ± 4.9	12.5 ± 2.1
Zitratlösung injiziert	6	24.9 ± 3.7	85.7 ± 4.9	30.1 ± 5.4
TTX injiziert	6	25.3 ± 3.6	81.2 ± 2.3	31.1 ± 4.2
B				
Unbehandelte Kontrollen	6	12.5 ± 2.1	90.6 ± 7.4	14.1 ± 2.7
Insektensalzlösung injiziert	6	24.9 ± 4.1	95.9 ± 4.1	25.6 ± 2.4
Zitratlösung injiziert	6	22.0 ± 3.4	87.1 ± 1.0	25.3 ± 4.1

Tab. 3 : Wirkung von Tetrodotoxin (TTX) auf die Aktivitäten der Fettkörperglykogenphosphorylase in geschürten Abdomen von Larven von *Manduca sexta*. TTX (1 mg/ml) wurde gegen Zitratlösung (5 mg/ml; pH 4.8) (A) bzw. Zitrat- gegen Insektensalzlösung (B) getestet. 3 h nach der Injektion von jeweils 20 µl wurden Fettkörperproben entnommen. Angegeben wurden Mittelwerte von n Messungen ± S.E.M.

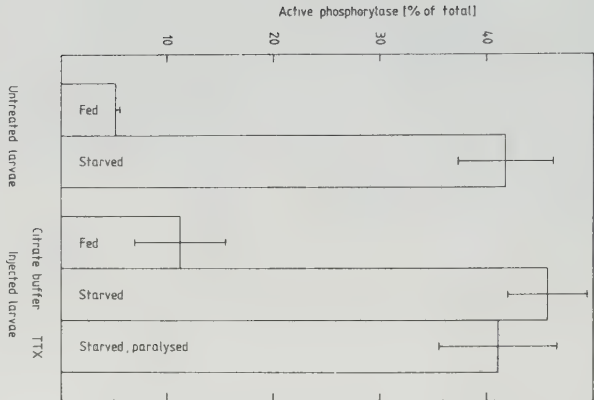


Abb. 50 : Aktivierung der Glykogenphosphorylase im Fettkörper von Larven, die mit Tetrodotoxin paralytisiert worden waren. 3 h nach Injektion wurden Fettkörperproben entnommen. Angegeben wurden die Mittelwerte ($n \geq 5$) $\pm$ S.E.M.

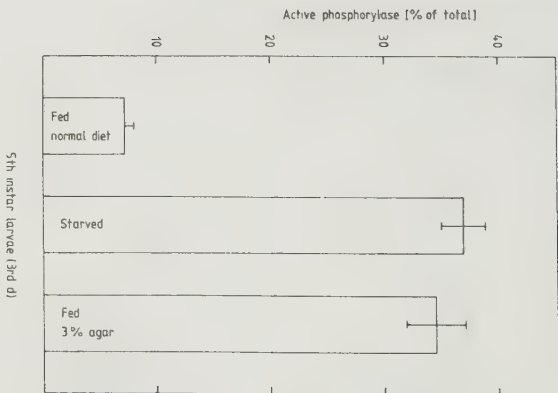


Abb. 51 : Aktivierung der Fettkörperglykogenphosphorylase in Larven, die 3 h mit 3 %igem Agar gefüttert worden waren. Angegeben wurden die Mittelwerte ($n \geq 5$) $\pm$ S.E.M.

hält keine Nährstoffe (BHASKARAN und JONES, 1980). Bei der Präparation der mit Agar gefütterten Larven wurde stets ein prall gefüllter Darm gefunden.

Während das Körpergewicht der Hungertiere innerhalb von 3 h um 6.4 % zurückging, nahm das der mit Normaldiät gefütterten Kontrollen um 5.4 % zu. Das Gewicht der mit Agar gefütterten Tiere wuchs um 1.6 %, wobei jedoch in 2 von 5 Fällen auch das Körpergewicht zurückging. Mit Agar gefütterte Tiere gaben mit 9.5 Kotballen/3 h mehr als mit Normaldiät gefütterte Tiere ab (6.8 Kotballen/3 h); Hungertiere lagen mit 3.4 Kotballen/3 h unter diesen Werten. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Larven das Agar als Futterersatz akzeptierten.

In mit Normaldiät gefütterten Kontrollen betrug der prozentuale Anteil der aktiven Phosphorylase an der Gesamtform 7 % (Abb. 51). In den Hungertieren wurden nach 3 h 37 % gefunden ($p < 0.001$); die mit Agar gefütterten Tiere lagen bei etwa 35 %. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zu den hungernden Larven, die langsame Leerung des Darmes ist somit nicht für die Aktivierung der Phosphorylase verantwortlich.

4.3.3. Wirkung von Extrakten der CcCa in unbehandelten Larven des 3. Tages vom 5. Larvenstadium

Während der betrachteten Hungerphase ist die Fettkörperglykogenphosphorylase fast ausschließlich am 3. Tag des Stadiums aktiviert. Um zu überprüfen, ob an diesem Entwicklungstag eine Aktivierung des Enzyms durch die Cc möglich ist, wurde 1/4 oder 1 Paar CcCa pro Tier injiziert. Es zeigte sich, daß beide Dosen zu fast identischen Aktivierungen der Fettkörperglykogenphosphorylase führten.

In den mit Insektensalzlösung injizierten Kontrolltieren des 3. Tages war der Prozentsatz der aktiven Phosphorylase mit 19 % recht hoch (Abb. 52). Während die Verabreichung von 1/4 Paar CcCa eine Steigerung auf 50 % erbrachte ($p < 0.01$), konnten 54 % nach der Injektion von 1 Paar registriert werden ($p < 0.01$). Darüberhinaus wurden die Aktivitäten der CcCa-Extrakte in geschnürten Abdomen getestet. Die mit Insektensalzlösung injizierten Abdomen wiesen

nach 10 min etwa 20 % aktive Form auf; dagegen führte die Verabreichung von 1/4 Paar CcCa zu einer Steigerung auf 74 % ($p < 0.001$). 1 Paar CcCa aktivierte die Fettkörperglykogenphosphorylase sogar auf 87 % ($p < 0.001$).

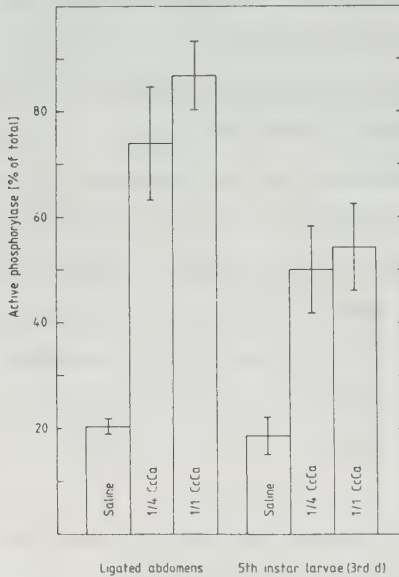


Abb. 52 : Aktivierung der Fettkörperglykogenphosphorylase durch Extrakte der CcCa in unbehandelten Larven (3. Tag des 5. Larvenstadiums) von *Manduca sexta*. In die Larven wurde 1/4 oder 1 Paar CcCa in 10 μ l Insektensalzlösung (+ 0.1 % Rinderserumalbumin) injiziert; 10 min später wurden Fettkörperproben entnommen. Angegeben wurden die Mittelwerte ($n \geq 5$) $\pm$ S.E.M.

4.3.4. Auswirkung der Entfernung der Corpora cardiaca und Corpora allata auf die Aktivierung der Fettkörperglykogenphosphorylase in hungernden Larven

Die Beteiligung der Corpora cardiaca an der durch Hunger induzierten Aktivierung der Fettkörperglykogenphosphorylase wurde durch Entfernung dieser Organe 20 h vor Hungerbeginn untersucht (Abb. 53). Die operierten Kontrolltiere

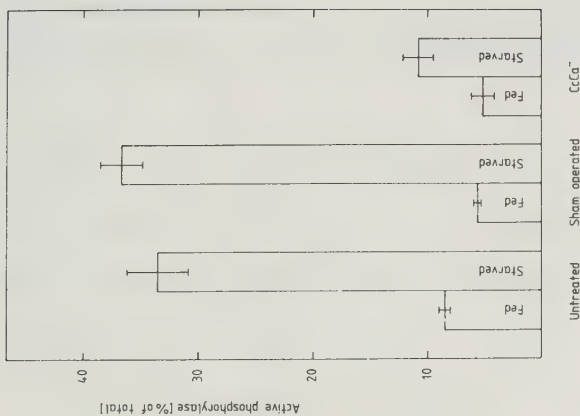


Abb. 53 : Aktivitäten der Glykogenphosphorylase im Fettkörper cardiectomierter, allatectomierter Larven von *Manduca sexta* nach 3 stündigem Hunger. Die Cc und Ca wurden wie in Abschnitt 3.5. beschrieben entnommen. Angegeben wurden die Mittelwerte ($n \geq 5$) $\pm$ S.E.M.

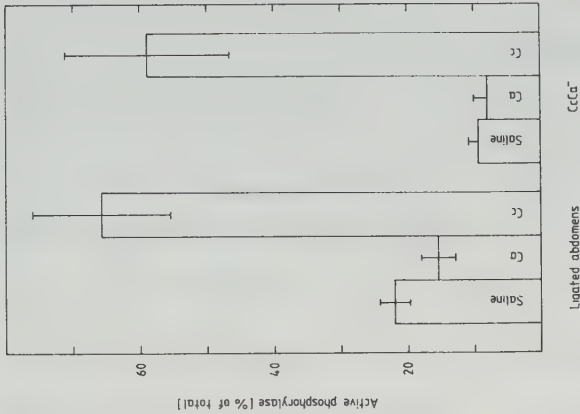


Abb. 54 : Aktivierung der Glykogenphosphorylase durch Extrakte larvaler Cc oder Ca in cardiectomierten, allatectomierten Larven von *Manduca sexta*. 1/2 Paar Cc oder Ca wurde in 10 μ l Insektensalzlösung (+ 0.1 % Rinderserumalbumin) injiziert und Fettkörper 10 min später entnommen. Die Extrakte wurden ebenfalls in geschnürten Abdomen getestet. Angegeben wurden die Mittelwerte ($n \geq 5$) $\pm$ S.E.M.

(sie enthielten noch ihre CcCa) aktivierten die Glykogenphosphorylase innerhalb von 3 h Hunger mit 37 % genauso hoch wie die unbehandelten Kontrolltiere (34 %). In den gefütterten Kontrolltieren betrug der prozentuale Anteil der aktiven Form an der Gesamtaktivität 6 bzw. 9 %.

In den hungernden Larven, denen die Cc und Ca entnommen worden waren, wurde die Fettkörperglykogenphosphorylase innerhalb von 3 h nur auf 11 % aktiviert, während die gefütterten Tiere 5 % aufwiesen. Obwohl auch diese geringe Differenz signifikant ist ($p < 0.01$), konnte nach Entfernung der Cc eine deutliche Ausfallerscheinung in hungernden Larven nachgewiesen werden.

Alle operierten Larven lagen mit 5 g deutlich unter dem Durchschnittsgewicht des 3. Tages (6.35 g), obwohl für die Operationen stets die Tiere mit dem größten Körpergewicht des 2. Tages des 5. Stadiums ausgewählt wurden. Als unbehandelte Kontrolltiere dienten Larven mit einem Gewicht von etwa 6 g.

4.3.5. Wirkung der Extrakte larvaler Corpora cardiaca und Corpora allata in cardiacectomierten, allatectomierten Larven

Wie schon in Abschnitt 3.5. erwähnt, mußten die Larven für diesen Versuch bereits am 1. Tag des 5. Larvenstadiums operiert werden. Auf diese Weise wurde gewährleistet, daß die Operationswunde bei der Injektion nicht aufbrach. Die operierten Versuchstiere wiesen am 3. Tag des 5. Stadiums ein Körpergewicht von nur 4 g auf.

In cardiacectomierten, allatectomierten gefütterten Larven wurde die Fettkörperglykogenphosphorylase nach Injektion von 1/2 Paar Cc innerhalb von 10 min auf etwa 60 % aktiviert ($p < 0.001$), während Extrakte der Ca in Bezug auf die Aktivierung der Fettkörperglykogenphosphorylase keine Wirkung zeigten. In mit Ca wie in mit Insektensalzlösung injizierten, cardiacectomierten, allatectomierten Larven blieb der Prozentsatz der aktiven Phosphorylase unter 10 % (Abb. 54).

Abb. 54 zeigt ebenfalls, daß in den mit Insektensalzlösung bzw. mit Ca-Extrakten injizierten geschnürten Abdomen die Glykogenphosphorylase nicht ak-

tiviert wurde. In Abdomen, die 1/2 Paar Cc erhielten, wurde dagegen das Enzym innerhalb von 10 min auf 60 % aktiviert ($p < 0.001$).

4.3.6. Gesamtzuckerkonzentrationen der Hämolymphe in cardiacectomierten, allatectomierten Larven nach 3 h Hunger

Der Ausfall der Phosphorylaseaktivierung in hungernden, cardiacectomierten Larven müßte zu einer Erniedrigung der Zuckerkonzentration in der Hämolymphe führen, da die aus diesem Organ entnommenen Kohlenhydrate nicht aus dem Fettkörperglykogen ergänzt werden können. Die gefundenen Gesamtzuckerwerte der Hämolymphe wurden in Trehalosekonzentrationen angegeben.

Die Meßwerte zeigen jedoch nach 3 stündigem Hungern keine Erniedrigung der Gesamtzuckerkonzentration in der Hämolymphe cardiacectomierter, allatectomierter Larven (Tab. 4). Sowohl gefütterte als auch gehungerte Tiere, die ihre Cc und Ca verloren hatten, wiesen mit 13.8 bzw. 14.4 mg Trehalose/ml sehr hohe Konzentrationen auf. Während unbehandelte, gefütterte und gehungerte Tiere 12.2 bzw. 13.9 mg/ml aufwiesen, wurden in den operierten Kontrolltieren Konzentrationen von 12.9 (gefüttert) und 13.8 mg/ml (gehungert) nachgewiesen. Keiner der beschriebenen Unterschiede war statistisch signifikant.

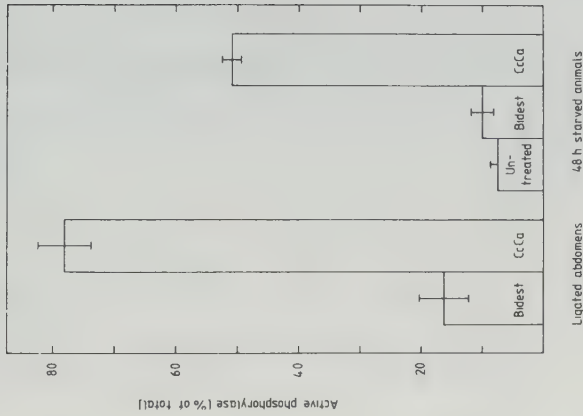
4.3.7. Aktivierung der Fettkörperglykogenphosphorylase durch Extrakte der CcCa in Larven, die 24 und 48 h gehungert worden waren

Durch die Injektion von CcCa-Extrakten in 24 bzw. 48 h hungernde Larven sollte festgestellt werden, ob die Cc die Sekretion des Phosphorylase aktivierenden Hormons nach längeren Hungerperioden einstellen oder ob die Phosphorylase des Fettkörpers nicht mehr auf das in der Hämolymphe befindliche Peptid reagieren kann.

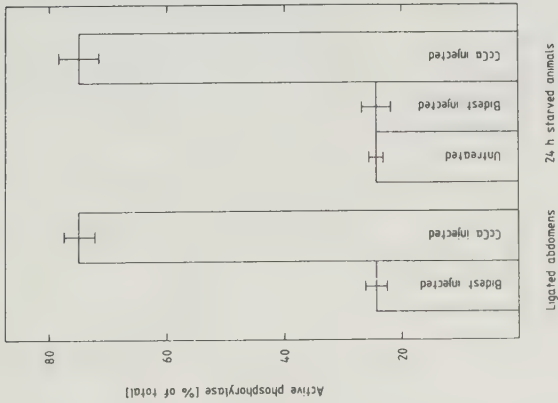
Es konnte gezeigt werden, daß die Phosphorylase des Fettkörpers in Tieren, die 24 bzw. 48 h gehungert worden waren, nach Injektion von 1 Paar CcCa aktiviert wurde.

		Gesamtzuckerkonzentration der Hämolymphe (angegeben als Trehalose)	
N		mg/ml	µmol/ml
Unbehandelt;gefüttert	5	12.3 ± 0.7	36.0 ± 2.0
Unbehandelt;gehungert	5	13.9 ± 1.4	40.6 ± 4.1
Kontrolloperiert;gefüttert	5	12.9 ± 0.8	37.7 ± 2.3
Kontrolloperiert;gehungert	5	13.8 ± 0.5	40.4 ± 1.5
CcCa ⁻ ;gefüttert	5	13.8 ± 0.8	40.4 ± 2.3
CcCa ⁻ ;gehungert	6	14.4 ± 0.8	42.1 ± 2.3

Tab. 4 : Gesamtzuckerkonzentration in der Hämolymphe cardiaectomierter, allatectomierter Larven von *Manduca sexta* nach 3 stündigem Hunger. Die Cc und Ca wurden wie beschrieben (3.5.) entnommen. Angegeben wurden die Mittelwerte von n Messungen ± S.E.M.



B



A

Abb. 55 A und 55 B : Aktivierung der Fettkörperglykogenphosphorylase in 24 h (A) und 48 h (B) gehungerten Larven von *Manduca sexta*. In hungernde Tiere wurde nach der angegebenen Zeitspanne das Äquivalent von 1 Paar CcCa mit 10 μ l Bi-dest. injiziert; 10 min später wurden Fettkörperproben für die Phosphorylasemessung entnommen. Angegeben wurden die Mittelwerte ($n = 5$) $\pm$ S.E.M.

In den 24 h gehungerten Tieren (Abb. 55 A) wiesen sowohl die unbehandelten als auch die mit Bidest. injizierten Larven 24 % aktive Form auf, während die Verabreichung von 1 Paar CcCa die Phosphorylase auf 75 % aktivierte ($p < 0.001$).

Das gleiche Bild zeigte sich in den 48 h gehungerten Larven; die Kontrollen enthielten weniger als 10 % aktive Form (Abb. 55 B). 10 min nach Injektion der CcCa-Extrakte konnten 51 % aktive Form nachgewiesen werden ($p < 0.001$).

Die Extrakte aktivierten die Fettkörperphosphorylase geschnürter Abdomen innerhalb von 10 min auf Werte zwischen 70 und 80 % ($p < 0.001$).

Da die in 24 und 48 h hungernden Larven injizierten Extrakte jeweils die Glykogenphosphorylase aktivierten, ist anzunehmen, daß in diesen Tieren der Hormontiter der Hämolymphe sehr niedrig ist und dies der Grund für den niedrigen Prozentsatz der aktiven Phosphorylase ist.

4.3.8. Injektion von Glucose und Trehalose in hungernde Larven

In hungernden Larven ist die Nachlieferung von Kohlenhydraten in die Hämolymphe verringert; dies könnte zur Aktivierung der Fettkörperglykogenphosphorylase führen. Deshalb wurde Glucose und Trehalose injiziert. 1 und 2 h nach Beginn der Hungerphase wurden jeweils so viele Kohlenhydrate verabreicht, daß die Gesamtzuckerkonzentration der Hämolymphe vor Versuchsbeginn annähernd verdoppelt wurde. Das bedeutet, daß 30 mg (166.5 μ mole) Glucose oder 28.5 mg (83.25 μ mole) Trehalose mit jeder Injektion von 50 μ l verabreicht wurden. Den Kontrolltieren wurden zweimal 50 μ l InsektensalzLösung injiziert. Nach insgesamt 3 h wurden die Proben für die Messungen entnommen.

In den mit Glucose behandelten Hungertieren war eine Aktivierung des Enzyms auf 24 % zu verzeichnen (Abb. 56); dieser Wert liegt zwischen den gefütterten und den hungernden, mit InsektensalzLösung injizierten Kontrolltieren und ist von beiden Kontrollen signifikant verschieden ($p < 0.01$).

Nach Trehaloseverabreichung wurde in hungernden Tieren eine Aktivierung der Phosphorylase auf 31 % festgestellt. Ein signifikanter Unterschied ist we-

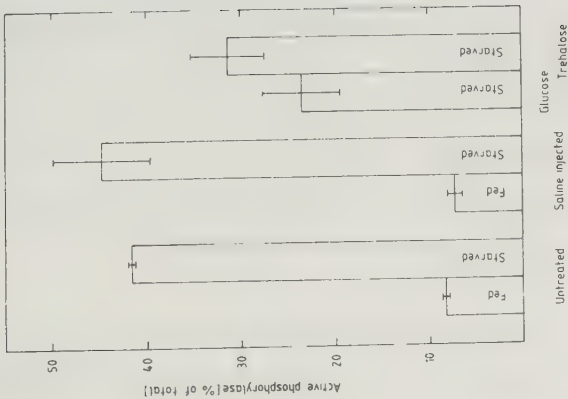


Abb. 56 : Aktivierung der Fettkörperglykogenphosphorylase in Larven von *Manduca sexta*, die 3 h hungrten und in dieser Zeit mit Glucose oder Trehalose injiziert worden waren. Die genaue Verfahrensweise ist im Text aufgeführt. Angegeben wurden Mittelwerte ($n \geq 5$) + S.E.M.

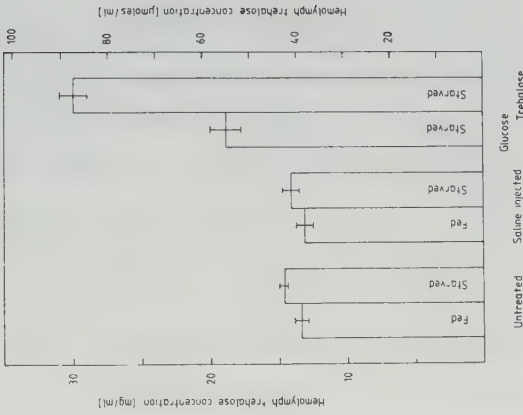


Abb. 57 : Trehalosekonzentration in der Hämolymphe von Larven von *Manduca sexta*, die 3 h hungrten und in dieser Zeit mit Glucose oder Trehalose injiziert worden waren. Die genaue Verfahrensweise ist im Text aufgeführt. Angegeben wurden Mittelwerte ($n \geq 5$) + S.E.M.

der gegen hungernde noch gegen mit Glucose injizierte Tiere vorhanden. Die gefütterten Kontrolltiere wiesen jeweils Werte unter 10 % auf.

In allen hungernden Kontrolltieren lag die Trehalosekonzentration der Hämolymphe etwas höher als in den gefütterten Tieren (Abb. 57); diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Nach Injektion von Glucose lagen die Trehalosewerte mit etwa 19 mg/ml um etwa 5 mg/ml über der Konzentration gehungerter Kontrollen ($p < 0.001$). Nach der Injektion von Trehalose wurde eine Verdopplung der Konzentration dieses Zuckers in der Hämolymphe auf etwa 30 mg/ml festgestellt ($p < 0.001$). Auch der Unterschied zwischen den Trehalosekonzentrationen in der Hämolymphe mit Glucose oder Trehalose injizierter Tiere war signifikant ($p < 0.001$).

In mit Glucose injizierten Hungertieren war die Konzentration dieses Zuckers nach 3 h mit etwa 500 µg/ml Hämolymphe höher als in den hungernden Tieren, die mit Insektensalzlösung injiziert worden waren oder unbehandelt blieben ($p < 0.05$; Abb. 58). Bei den nicht injizierten aber gehungerten Kontrollen wurde innerhalb von 3 h ein starkes Absinken der Glucosekonzentration festgestellt ($p < 0.001$). Die Kontrollinjektionen von Insektensalzlösung führten in gefütterten Tieren dazu, daß die Glucosekonzentration etwas niedriger als in unbehandelten Larven lag. Dagegen war die Konzentration in mit Insektensalzlösung injizierten, gehungerten Tieren mit etwa 85 µg/ml doppelt so hoch wie in den unbehandelten Kontrollen (35 µg/ml, $p < 0.002$). Nach der Verabreichung von Trehalose in Hungertiere lag die Glucosekonzentration nur wenig höher als in den injizierten, gehungerten Kontrolltieren.

Das Ergebnis zeigt, daß bei den für die Injektion gewählten Kohlenhydratmengen nur Glucose einen Effekt zeigt und die Phosphorylaseaktivierung vermindert.

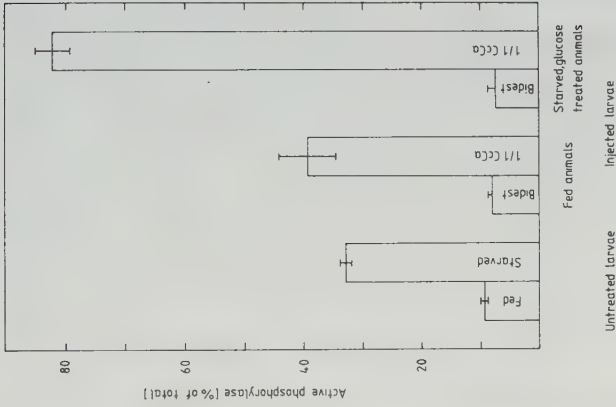


Abb. 59 : Aktivierung der Fettkörperglykogenphosphorylase in hungernden, mit Glucose injizierten Larven durch Extrakte der CcCa-Einheiten der Behandlung sind im Text dargestellt. Die Extrakte wurden ebenfalls in gefütterten Larven (3. Tag) getestet. Angegeben wurden Mittelwerte ($n \geq 5$) + S.E.M.

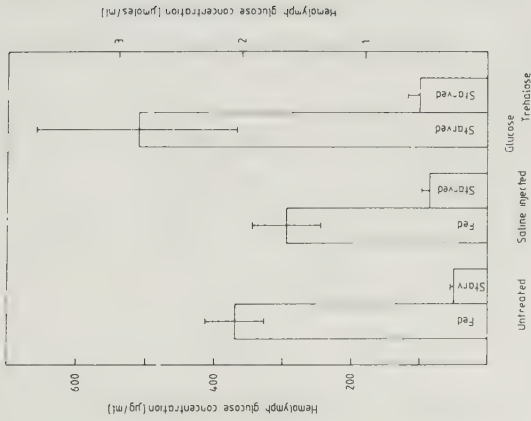


Abb. 58 : Glucosekonzentrationen in der Hämolymphe von Larven von *Manduca sexta*, die 3 h hungerten und in dieser Zeit mit Glucose oder Trehalose injiziert worden waren. Die genaue Verfahrensweise ist im Text dargestellt. Angegeben wurden Mittelwerte ($n \geq 5$) + S.E.M.

4.3.9. Wirkung von Extrakten der CcCa in mit Glucose behandelten Hungertieren

Die Verminderung der Phosphorylaseaktivierung in hungernden Larven von *Manduca sexta* nach Glucoseverabreichung kann darin begründet sein, daß durch erhöhte Glucosespiegel der Hämolymphe die Ausschüttung des aktivierenden Peptids aus den Cc herabgesetzt wird oder der Fettkörper nicht auf das in der Hämolymphe befindliche Peptid anspricht. Deshalb wurde nach 3 h Hunger in mit Glucose vorbehandelte Tiere 1 Paar CcCa injiziert, um zu testen, ob unter diesen Bedingungen die Fettkörperglykogenphosphorylase aktiviert wird. Die injizierte Glucosemenge wurde gegenüber Abschnitt 4.3.8. um 10 % erhöht, um vielleicht die Phosphorylaseaktivierung noch stärker unterdrücken zu können. Der Versuchsablauf wurde jedoch im übrigen nicht weiter verändert. Die Wirksamkeit der verwendeten Extrakte wurde in gefütterten Larven des 3. Tages getestet, um einen direkten Vergleich zu den mit Glucose behandelten Hungertieren zu haben.

In Hungertieren, denen zweimal 33 mg Glucose verabreicht worden war, wurde die Aktivierung der Fettkörperglykogenphosphorylase vollständig verhindert; gegenüber den gefütterten Kontrolltieren war kein Unterschied feststellbar (Abb. 59). Nach Injektion von 1 Paar CcCa in mit Glucose vorbehandelte Tiere konnte eine Aktivierung der Glykogenphosphorylase auf mehr als 80 % festgestellt werden ($p < 0.001$).

In unbehandelten Kontrolltieren zeigte sich nach 3 h Hunger wieder eine deutliche Phosphorylaseaktivierung (33 % ; Kontrollen 9 % ; $p < 0.001$). Die CcCa-Extrakte führten zu einer Erhöhung der aktiven Form in unbehandelten, gefütterten Larven von 8 auf 39 % ($p < 0.001$).

4.3.10. Verfütterung von Agar (3 %), das 3.2 % Saccharose enthielt

Die Injektion einer geeigneten Glucosemenge in hungernde Larven unterdrückt die Aktivierung der Phosphorylase vollständig (4.3.9.). Es treten jedoch zum Zeitpunkt der Verabreichung unphysiologisch hohe Glucosekonzentra-

tionen in der Hämolymphe auf, die andere Effekte hervorrufen können als eine konstante physiologische Konzentration. Eine kontinuierliche Zuckerinfusion wäre ideal gewesen; da dies nicht möglich war, wurde eine Diät an die Tiere verfüttert, die neben 3 % Agar (4.3.2.) die Saccharosemenge enthielt, die normalerweise im Futter vorhanden ist (3.2 %). Die Larven fraßen die Normaldiät, 3 %iges Agar und Agar mit 3.2 % Saccharose in etwa gleichen Mengen.

Es zeigte sich, daß die mit dieser Diät innerhalb von 3 h aufgenommene Saccharosemenge ausreicht, um die Aktivierung der Fettkörperglykogenphosphorylase zu verhindern (Abb. 60). In diesen Tieren wurde ein prozentualer Anteil des aktiven Enzyms von 7 % gefunden; in Tieren, die die normale Diät aufgenommen hatten, lagen 6 % aktive Form vor. Hungertiere und Tiere, die mit 3 %igem Agar gefüttert worden waren, wiesen mit 35 % gleiche Werte auf.

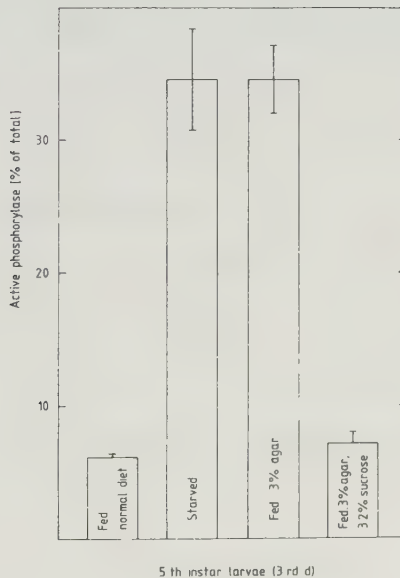


Abb. 60 : Aktivitäten der Fettkörperglykogenphosphorylase in Larven von *Manduca sexta*, die 3 h mit 3 %igem Agar gefüttert worden waren, das 3.2 % Saccharose enthält. Angegeben wurden die Mittelwerte ($n \geq 5$) $\pm$ S.E.M.

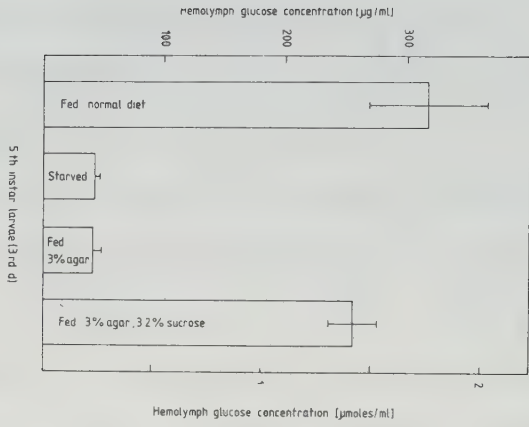


Abb. 61 : Glucosekonzentrationen in der Hämolymphe von *Manduca sexta*. Die Larven wurden für 3 h mit 3 %igem Agar gefüttert, das 3.2 % Saccharose enthielt. Angegeben wurden die Mittelwerte ($n \geq 5$) $\pm$ S.E.M.

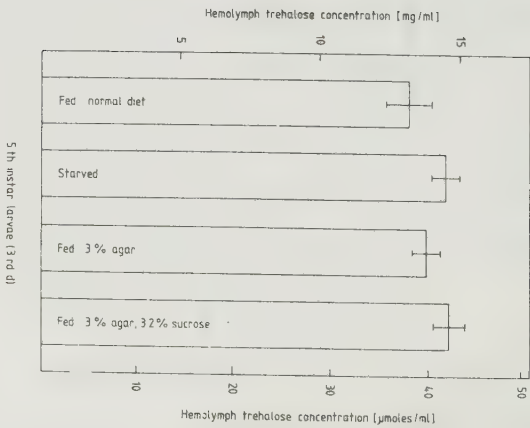


Abb. 62 : Trehalosekonzentrationen in der Hämolymphe von *Manduca sexta*. Die Larven wurden für 3 h mit 3 %igem Agar gefüttert, das 3.2 % Saccharose enthielt. Angegeben wurden Mittelwerte ($n \geq 5$) $\pm$ S.E.M.

Sowohl in den mit Normaldiät (320 µg/ml) als auch in den mit Saccharose/Agar gefütterten Larven (260 µg/ml; zwischen beiden Werten konnte kein signifikanter Unterschied gefunden werden) war die Glucosekonzentration der Hämolymphe signifikant höher ($p < 0.001$) als in den mit Agar gefütterten oder hungernden Larven (jeweils etwa 40 µg/ml; Abb. 61).

Die Trehalosekonzentrationen der Hämolymphe wurden weder durch die Verfütterung von 3 %igem Agar noch von Agar mit 3.2 % Saccharose signifikant beeinflusst (Abb. 62).

4.3.11. Verfütterung von Agar (3 %), das verschiedene Kohlenhydrate (3.2 %) enthielt

Durch die Verfütterung von Agar, das 3.2 % Saccharose enthielt, wurde zwar die Aktivierung der Phosphorylase verhindert und ein hoher Glucosespiegel in der Hämolymphe aufrechterhalten, der an der Regulation der Ausschüttung des Phosphorylase aktivierenden Peptids aus den Cc beteiligt sein könnte, doch könnte auch die in der Saccharose enthaltene Fructose eine Rolle spielen. Deshalb wurde Fructose und Glucose getrennt mit Agar verfüttert, außerdem Trehalose und Saccharose (jeweils 3.2 %). Neben den Phosphorylaseaktivitäten des Fettkörpers und Glucose- und Trehalosekonzentrationen der Hämolymphe wurde auch deren Fructosekonzentration gemessen.

In allen Tieren, die mit Agar gefüttert worden waren, das 3.2 % Kohlenhydrate enthielt, wurde die Phosphorylase nicht aktiviert (Abb. 63). In Larven, die nur Agar verfüttert bekamen, wurde das Enzym wie in hungernden Tieren auf über 30 % aktiviert ($p < 0.001$).

Der Unterschied zwischen den Glucosekonzentrationen in gefütterten (350 µg/ml) und gehungerten Larven (40 µg/ml) war signifikant ($p < 0.001$) (Abb. 64). Tiere, die entweder nur Agar oder Agar mit Fructose oder Trehalose erhielten, wiesen ebenfalls niedrige Glucosekonzentrationen auf. Nur in mit

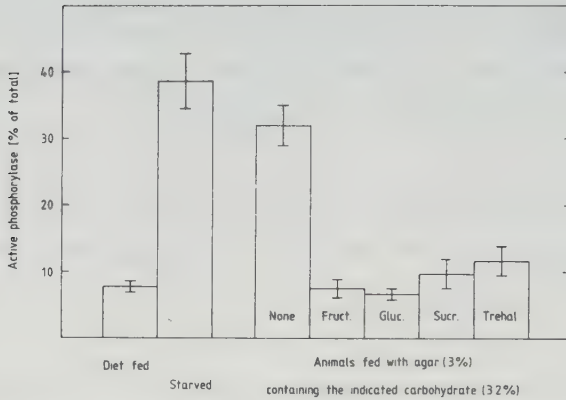


Abb. 63 : Aktivitäten der Fettkörperglykogenphosphorylase in Larven von *Manduca sexta*, die 3 h mit 3 %igem Agar gefüttert wurden. Das Agar enthielt 3.2 % der jeweils angegebenen Zucker. Aufgetragen wurden die Mittelwerte ($n \geq 5$) $\pm$ S.E.M.

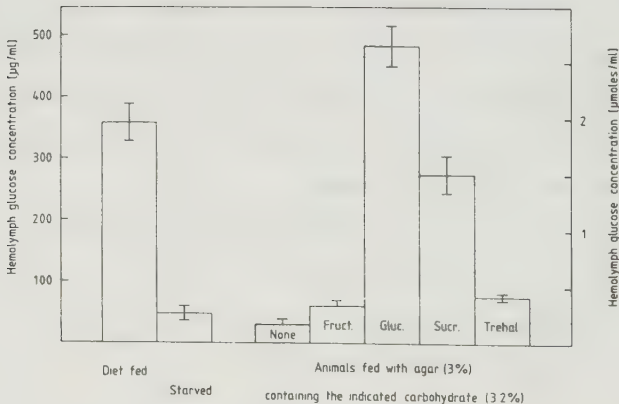


Abb. 64 : Glucosekonzentrationen in Larven von *Manduca sexta*, die 3 h mit 3 %igem Agar gefüttert wurden. Das Agar enthielt 3.2 % der jeweils angegebenen Zucker. Aufgetragen wurden Mittelwerte ($n \geq 5$) $\pm$ S.E.M.

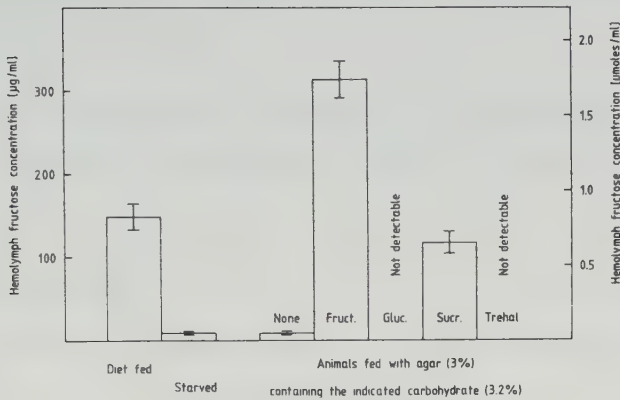


Abb. 65 : Fructosekonzentrationen in Larven von *Manduca sexta*, die 3 h mit 3 %igem Agar gefüttert wurden. Das Agar enthielt 3.2 % der jeweils angegebenen Zucker. Aufgetragen wurden Mittelwerte ($n \geq 5$) $\pm$ S.E.M.

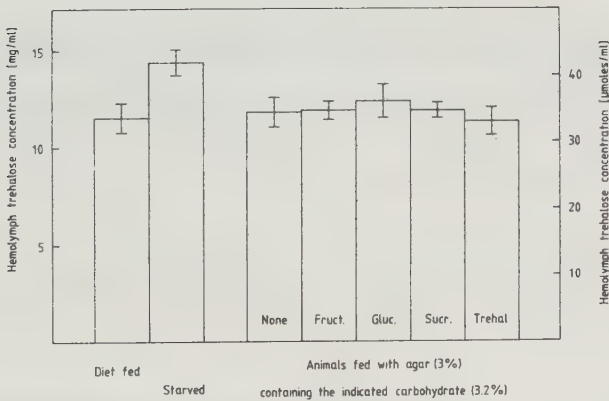


Abb. 66 : Trehalosekonzentrationen in Larven von *Manduca sexta*, die 3 h mit 3 %igem Agar gefüttert wurden. Das Agar enthielt 3.2 % der jeweils angegebenen Zucker. Aufgetragen wurden Mittelwerte ($n \geq 5$) $\pm$ S.E.M.

Glucose oder Saccharose gefütterten Larven lagen die Glucosekonzentrationen signifikant höher (jeweils $p < 0.001$) und waren auch voneinander verschieden ($p < 0.01$).

Die Fructosekonzentration der Hämolymphe von mit Normaldiät gefütterten Tieren lag etwa $200 \mu\text{g/ml}$ niedriger als die Glucosekonzentration ($p < 0.001$; Abb. 65); sie fiel innerhalb von 3 h Hunger von 150 auf $10 \mu\text{g Fructose/ml}$ ab ($p < 0.001$). Larven die nur Agar erhielten, wiesen ebenfalls Werte von $10 \mu\text{g/ml}$ auf. In Tieren, die mit Trehalose bzw. Glucose gefüttert worden waren, war Fructose nicht nachweisbar; dagegen lag die Konzentration dieses Zuckers in mit Saccharose und Fructose gefütterten Larven signifikant höher ($p < 0.001$).

In allen Versuchstieren wurden nach 3 h unveränderte Trehalosekonzentrationen (etwa 12 mg/ml) gefunden (Abb. 66). Nur in Tieren, die 3 h hungerten, konnte ein Anstieg der Trehalosekonzentration auf dem 5-Prozent-Niveau gegen den Wert der gefütterten Tiere statistisch gesichert werden.

In allen Tieren, die mit Agar gefüttert wurden, das Kohlenhydrate enthielt, war die Fettkörperglykogenphosphorylase nicht aktiviert worden. Die Trehalosekonzentration blieb unverändert. Es zeigte sich, daß verfütterte Monosaccharide nur die Hämolympfkonzentration des entsprechenden Kohlenhydrats stabilisieren konnten. Saccharose beeinflusste sowohl die Glucose- als auch die Fructosekonzentrationen; dagegen fiel in mit Trehalose gefütterten Larven die Spiegel dieser beiden Monosaccharide stark ab.

4.3.12. Auswirkung der Injektion von 6-Deoxy-D-Glucose auf die Aktivierung der Fettkörperglykogenphosphorylase in hungernen Larven von *Manduca sexta*

Da ein Teil der bisher beschriebenen Ergebnisse dafür sprach, daß eine hohe Glucosekonzentration der Hämolymphe (etwa $500 \mu\text{g/ml}$) möglicherweise die

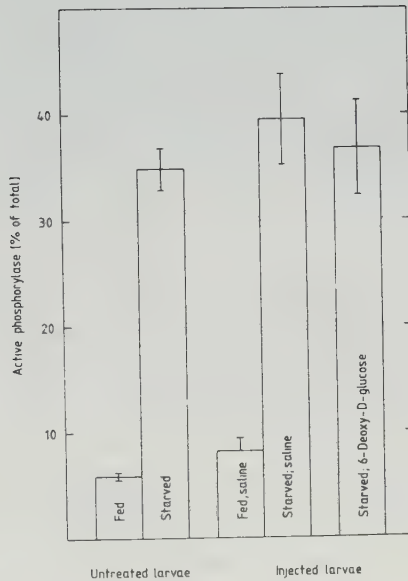


Abb. 67 : Aktivierung der Glykogenphosphorylase in hungernden Larven von *Manduca sexta*, denen 6-Deoxy-D-Glucose injiziert worden war, um eine Hämolymp hkonzentration von 0.5 bis 1.0 mg/ml zu erreichen. 3 h nach der Injektion wurden Fettkörperproben entnommen. Angegeben wurden Mittelwerte ($n = 6$) $\pm$ S.E.M.

Sekretion des Phosphorylase aktivierenden Hormons aus den Cc von *Manduca sexta* verhindert, wurde versucht, die nach Hungerbeginn absinkende Glucosekonzentration (Abb. 37) mit nicht metabolisierbarer Glucose zu stabilisieren. Dazu wurde 6-Deoxy-D-Glucose gewählt; in diesem Molekül fehlt in Stellung 6 ein Sauerstoffatom, wodurch eine Phosphorylierung durch Hexokinase zu Glucose-6-Phosphat und eine weitere Metabolisierung unmöglich erscheint. Je 3 Versuchstiere erhielten mit 20 μ l Insektensalzlösung 1 oder 2 mg 6-Deoxy-D-Glucose verabreicht, was Endkonzentrationen von etwa 0.5 oder 1.0 mg/ml entspricht. Nach Injektion hun-

gerten die Tiere 3 h. Unbehandelte und mit 20 µl Insektensalzlösung injizierte und gefütterte Larven wurden ebenfalls gemessen.

Die Verabreichung von 6-Deoxy-D-Glucose unterdrückte die Aktivierung der Glykogenphosphorylase in hungernden Larven nicht (Abb. 67). Es zeigte sich also, daß wahrscheinlich eine hohe Hämolympheglucosekonzentration nicht direkt die Phosphorylaseaktivierung in hungernden Larven verhindern kann.

4.4. Auswirkung der Entnahme von Cc und Ca auf die innerhalb der späten Larvalentwicklung auftretenden Aktivierungen der Fettkörperglykogenphosphorylase

4.4.1. Häutung vom 4. zum 5. Larvenstadium

Die Entnahme der Cc 24 h vor der Messung der Phosphorylaseaktivitäten in Tieren des 3. Tages (L 4) war nicht möglich. Obwohl die Ca sehr leicht zu finden waren, gelang es nicht, die Cc in diesen Larven zu präparieren. Selbst mit feinsten Pinzetten (Dumont 5 B) konnten die Cc nicht freigelegt werden, ohne die Larven stark zu beschädigen.

4.4.2. Wandernde Larven

Den Versuchstieren wurden am 2. Tag des 5. Larvenstadiums die Cc und Ca entnommen. Alle operierten Tiere befanden sich am 5. Tag des Stadiums wie die unbehandelten Kontrolltiere in der Wanderphase, hatten jedoch stets ein geringeres Körpergewicht als unbehandelte wandernde Larven.

Es zeigte sich, daß in unbehandelten Kontrollen dieser Versuchsreihe eine Aktivierung der Phosphorylase auf 30 % während der Wanderphase, wie sie bei der Untersuchung des 5. Larvenstadiums aufgetreten war (Abb. 8), nicht nachzuweisen war (Tab. 5). In allen Versuchsgruppen (unbehandelte, kontrolloperierte und cardiectomierte, allatectomierte Larven) betrug der prozentuale Anteil der aktiven Form an der Gesamtaktivität der Phosphorylase durchschnittlich 15 bis 18 %.

Es kann deshalb nicht gesagt werden, ob die Cc an der Aktivierung der Glykogenphosphorylase während der Wanderphase von *Manduca sexta* beteiligt sind. Die gefundenen Werte liegen so niedrig, daß eine Aktivierung des Enzyms zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung überhaupt zweifelhaft erscheinen könnte. Es findet jedoch sicherlich eine statt, da ZIEGLER (in Vorbereitung) ebenfalls von einer Erhöhung des prozentualen Anteils der aktiven Fettkörperglykogenphosphorylase während der Wanderphase von *Manduca sexta* berichtet. Das Ausmaß der Aktivierung kann jedoch unterschiedlich sein.

Schon am Beginn der vorliegenden Untersuchung wurde beobachtet, daß der Zeitpunkt der stärksten Aktivierung des Enzyms während der Wanderphase Fluktuationen unterliegt. Deshalb wurde die Hälfte der Versuchstiere am 5. Tag um 21 Uhr, die andere Hälfte am 6. Tag um 9 Uhr untersucht. Die Ergebnisse beider Versuchsgruppen unterschieden sich nicht voneinander, sie wurden deshalb in Tab. 5 vereint.

	N	Aktive Form (U/mg)	Gesamtaktivität (U/mg)	Aktive Form (% der Gesamtaktivität)
Unbehandelte Larven	13	10.7 $\pm$ 1.0	68.8 $\pm$ 3.9	15.6 $\pm$ 1.4
Kontrolloperierte Larven	12	10.7 $\pm$ 1.0	67.5 $\pm$ 4.1	15.7 $\pm$ 1.0
CcCa ⁻	14	13.8 $\pm$ 1.0	78.2 $\pm$ 3.9	17.8 $\pm$ 1.3

Tab. 5 : Aktivitäten der Fettkörperglykogenphosphorylase in cardiacectomierten, allatectomierten wandernden Larven von *Manduca sexta*. Die Cc und Ca wurden wie beschrieben (3.5.) am 2. Tag des 5. Stadiums entnommen. Am 5. Tag um 21.00 oder am 6. Tag um 9.00 wurden Fettkörperproben für die Messung der Phosphorylaseaktivitäten entnommen. Angegeben wurden die Mittelwerte von n Messungen $\pm$ S.E.M.

5. Diskussion

5.1. Die späte Larvalentwicklung von *Manduca sexta*

Die Larvalentwicklung von Insekten ist durch das Wechselspiel von Häutungen und Freißphasen gekennzeichnet. Innerhalb der Freißphasen nehmen die Schmetterlingslarven an Gewicht zu und häufen Kohlenhydrat-, Lipid- und Proteinreserven in Fettkörper und Hämolymphe an, die sie während der Häutungen, vor allem jedoch während Adultentwicklung und Adultleben verbrauchen.

Die aus dem Ei geschlüpften Larven von *Manduca sexta* wiegen etwa 1 mg, während das Gewicht der Tiere am Ende des 4. Larvenstadiums etwas mehr als 1 g beträgt; es erfolgt also eine Zunahme um den Faktor 10^3 (eigene Beobachtungen; REINECKE, BUCKNER und GRUGEL, 1980). In dem betrachteten Zeitraum konsumieren die Tiere weniger als 5 g Diät (genauere Daten liegen nicht vor). In die Freißphase des 5. Larvenstadiums fallen bei *Manduca sexta* etwa 90 % des gesamten Wachstums, doch nimmt das Körpergewicht in etwa nur um den Faktor 10 zu. Während dieses Entwicklungsabschnittes nehmen die Tiere etwa 20 g Nahrung auf und ihr Gewicht wächst von etwas mehr als 1 g auf etwa 9 g. Tiere, die sich im normalen Rhythmus entwickeln, stellen in der Nacht vom 4. zum 5. Tag des letzten Larvenstadiums die Nahrungsaufnahme ein und nehmen deshalb nicht mehr an Körpergewicht zu. Der folgende Rückgang des Körpergewichts, nach den vorliegenden Werten zwischen Tag 5 und Tag 7 am stärksten, läuft bis zur Puppenhäutung weiter. Bereits vor der Wanderphase geben die Larven Flüssigkeit beim sogenannten "body-wetting" ab. Nach der Wanderung formen die Tiere in der Erde einen Kokon; bei dieser Aktivität gehen bis zu 40 % des Körpergewichts verloren (REINECKE, BUCKNER und GRUGEL, 1980).

Die gefundenen Absolutwerte und Veränderungen der Körpergewichte von *Manduca sexta* entsprechen den schon mehrfach beschriebenen Werten sehr gut (HETTICK und BADE, 1979; PRESCOTT, SANES und JEWETT, 1978; REINECKE, BUCKNER und

GRUGEL,1980;WILLIAMS-BOYCE und JUNGREIS,1980).Geringfügige Unterschiede der angegebenen Körpergewichte zu Literaturwerten können damit zusammenhängen,daß die Tiere in Bezug auf die Photoperiode zu unterschiedlichen Zeiten gewogen und mit unterschiedlichen Diäten aufgezogen wurden (REINECKE,BUCKNER und GRUGEL,1980).

Die Veränderungen des Hämolympfvolumens folgen denen des Körpergewichts recht deutlich.Das Hämolympfvolumen wird innerhalb des 5. Larvenstadiums bis zum 5. Tag etwa versechsfacht,während das Körpergewicht etwa verneunfacht wird.Vom 5. zum 6. Tag nimmt das Volumen um etwa 1 ml auf 2 ml ab.Nach der Wanderphase verändert sich das Hämolympfvolumen der Tiere kaum und beträgt in den Puppen etwas weniger als 2 ml.Erst während der etwa 20tägigen Adultentwicklung wird das Hämolympfvolumen verringert;kurz vor der Adulthäutung enthalten Weibchen etwa 0.8,Männchen 0.7 ml (SIEGERT,1980).Mit Anteilen von 35 bis 40 % am Körpergewicht ist das Hämolympfvolumen während des gesamten betrachteten Zeitraumes recht konstant.Diese Werte befinden sich im Einklang mit Angaben von RIDDIFORD (1978; 31 %) und RIDDIFORD und CURTIS (1978; 42 %). Im Gegensatz dazu fanden WILLIAMS-BOYCE und JUNGREIS (1980) für die Pharatepuppenzeit von *Manduca sexta* mit 40 bis 50 % relativ hohe Anteile des Hämolympfvolumens am Körpergewicht.

Die während der letzten 36 h des 4. Larvenstadiums gefundenen Proteinkonzentrationen der Hämolymphe stimmen mit den von GOODMAN und GILBERT (1978) für *Manduca sexta* berichteten sehr gut überein.Innerhalb der Freßphase des letzten Stadiums steigt die Proteinmenge der Hämolymphe,aber auch des Fettkörpers,stark an;in dieser Zeit nehmen die Tiere mit etwa 20 g Diät etwa 1.2 g Protein auf.Die Proteinmenge in beiden Organen nimmt von insgesamt 6 (Tag 3; L 4) auf 176 mg (Tag 5;L 5) zu.Obwohl während der Wanderphase keine Nahrung aufgenommen wird,steigt die Proteinkonzentration der Hämolymphe innerhalb von 12 h nochmals um etwa 30 mg/ml;einer der möglichen Gründe dafür könnte die

Abnahme des Hämolympfvolumens in dieser Zeit sein. Die Proteinmenge in der Hämolymphe nimmt gleichzeitig nur um 10 mg auf 160 mg zu.

KRAMER, MUNDALL und LAW (1980) gaben einen Kurvenverlauf für die Hämolympheproteinkonzentration während der späten Larvalentwicklung von *Manduca sexta* an, der dem hier beschriebenen entspricht, doch zeigen die Absolutwerte deutliche Unterschiede. KRAMER, MUNDALL und LAW fanden, daß am Beginn des 5. Stadiums die Werte um 5 mg/ml höher, während der Wanderphase aber um 20 mg/ml niedriger liegen als in der vorliegenden Untersuchung. In *Manduca sexta* tritt das Aminosäurespeicherprotein Manducin auf, das zu Beginn des 5. Larvenstadiums etwa 20 %, in der Pharatepuppenzeit etwa 50 bis 80 % der Hämolympheproteine ausmacht (KRAMER, MUNDALL und LAW, 1980).

Die Proteinmenge des Fettkörpers nimmt bis zum 4. Tag des 5. Larvenstadiums zu, verändert sich aber in den folgenden 2 Tagen nicht mehr. Da in diesem Zeitraum die Proteinmenge der Hämolymphe um fast 50 mg ansteigt, kann vermutet werden, daß im Fettkörper Proteine synthetisiert und an die Hämolymphe abgegeben werden. In der Folgezeit nimmt der Proteingehalt des Fettkörpers bis zum 9. Tag des Stadiums um etwa 95 mg zu. Die Hämolymphe verliert dagegen im gleichen Zeitraum etwa 64 mg Protein, sodaß die Differenz von etwa 30 mg aus anderen Quellen, z.B. Proteinsynthese etc., stammen muß. Andererseits wird während der Wanderphase Insecticyanin aus den Epidermiszellen an die Hämolymphe abgegeben (RIDDIFORD, 1981); dieser Vorgang kann durch den Verlust der kräftigen türkisblauen Färbung in den wandernden Larven beobachtet werden. Das Insecticyanin könnte ebenfalls in den Fettkörper aufgenommen werden.

Die in Fettkörper und Hämolymphe von *Manduca sexta* zusammen vorhandenen Proteinmengen nehmen in den Weibchen zwischen Tag 9 (L 5) und dem 2. Tag der Puppenzeit nur geringfügig um etwa 30 mg, in den Männchen dagegen um 70 mg ab; möglicherweise werden diese Proteine bei der Umwandlung der Larven in Puppen benötigt.

Die Proteinkonzentration der Hämolymphe wird wohl während der Puppenzeit konstant gehalten, da sowohl in Diapausepuppen (nach 50 Tagen; SIEGERT, unverfö-

fentlichte Werte) als auch in pharatadulten und jungen adulten Tieren von *Manduca sexta* (SIEGERT,1980) 40 mg Protein/ml gefunden wurden.Insgesamt sind in Fettkörper und Hämolymphe von Diapausepuppen 173 mg (Weibchen) bzw. 123 mg (Männchen) vorhanden,wobei der Fettkörper der Weibchen 90 mg,der der Männchen 50 mg enthält.In beiden Geschlechtern werden innerhalb der ersten 50 Tage der Diapause nur 20 mg aus diesem Pool entnommen.Adulte Tiere enthalten nach dem Schlüpfen in beiden Organen zusammen nur noch ein Drittel des Ausgangswertes der jungen Puppen,sodaß der größte Teil der Proteinreserven vor allen Dingen während der Adultentwicklung verbraucht wird.

Die DNA-Menge des Fettkörpers wird bei *Manduca sexta* während des betrachteten Zeitraums viermal repliziert;diese Verdopplungen der DNA-Menge finden am 1.,6.,7. und 8. Tag nach der Häutung zum 5. Larvenstadium statt.Während der Freßphase des Stadiums findet also keine DNA-Synthese statt.Anscheinend werden einige,jedoch nicht alle Entwicklungsschritte durch vorhergehende DNA-Synthesen vorbereitet oder begleitet (WIELGUS,BOLLENBACHER und GILBERT,1979).Z.B. formen Schuppen bildende Zellen von Schmetterlingen keine Schuppen,bevor sie nicht zwei Runden DNA-Synthese absolviert haben (KRISHNAKUMARAN,BERRY,OBERLANDER und SCHNEIDERMAN,1967).Die DNA-Synthesen im Fettkörper können von entwicklungsbiologischer Bedeutung für kommende Entwicklungsabschnitte sein.WIELGUS, BOLLENBACHER und GILBERT (1979) berichteten von einer Ecdyson-unabhängigen (nach 2 Tagen + 18 h des 5. Stadiums) und einer Ecdyson-abhängigen (nach 3 Tagen + 18 h) Phase der DNA-Synthese in Epidermiszellen von Larven von *Manduca sexta*.Beide Phasen sind mit keiner der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen DNA-Synthesen im Fettkörper zeitlich korrelierbar.Wenn im Fettkörper die DNA-Menge verdoppelt wird,ist die Ecdysonkonzentration in den Gesamttieren (BOLLENBACHER,VEDECKIS,GILBERT und O'CONNOR,1975) bzw. in der Hämolymphe (BOLLENBACHER,SMITH,GOODMAN und GILBERT,1981) erhöht,sodaß stets von Ecdyson-abhängigen DNA-Synthesen gesprochen werden kann.Auf jeden Fall verhalten sich anscheinend Fettkörper und Epidermis von *Manduca sexta* in Bezug auf die DNA-

Synthesefrequenz unterschiedlich, was mit den unterschiedlichen Funktionen beider Organe zusammenhängen könnte. Auch während des letzten Larvenstadiums von *Calpodus ethilius* wird in Epidermis und Fettkörper zu verschiedenen Zeiten DNA verdoppelt (LOCKE, 1970).

Die spezifischen Aktivitäten der gesamten Fettkörperglykogenphosphorylase nehmen während der Freßphase des 5. Larvenstadiums von *Manduca sexta* langsam ab. Im Laufe der Wanderphase kommt die Erhöhung der spezifischen Aktivität der Gesamtposphorylase wahrscheinlich dadurch zustande, daß die Enzymsynthese vom 4. zum 5. Tag des Stadiums im Fettkörper weiterläuft, der Proteingehalt des Organs jedoch nicht weiter zunimmt (s.o.). Der dramatische Rückgang der spezifischen Phosphorylaseaktivitäten in der Pharatpuppenzeit kommt dagegen zustande, weil die Enzymmenge im Fettkörper mehr oder weniger unverändert bleibt, der Proteingehalt des Organs jedoch beträchtlich ansteigt.

In Puppen zeigen sich geschlechtsspezifische Unterschiede in den spezifischen Aktivitäten der Gesamtposphorylase; die Männchen weisen höhere Werte als die Weibchen auf. Da die Meßwerte in den Pharatpuppen nicht stärker als in den Puppen variieren, treten diese Unterschiede anscheinend erst in den Puppen auf.

Üblicherweise werden Enzymaktivitäten als spezifische Aktivitäten, also Enzymaktivität pro löslichem Protein, angegeben; da sich der Proteingehalt des Fettkörpers während des 5. Larvenstadiums von *Manduca sexta* wie oben beschrieben stark verändert, ist es nicht sinnvoll, die Gesamtaktivität der Glykogenphosphorylase auf Protein zu beziehen. Deshalb wurde zunächst als Bezugsgröße der DNA-Gehalt des Fettkörpers gewählt. Es zeigte sich jedoch, daß die DNA-Menge des Fettkörpers innerhalb des Beobachtungszeitraumes mehrmals verdoppelt wird (s. 4.1.3.). Zwar läßt sich durch den Bezug auf DNA für die Phosphorylaseaktivitäten eine sinnvolle Kurve erstellen, doch ist es geeigneter die Gesamtmenge der Glykogenphosphorylase pro Fettkörper zu bestimmen (s. 4.1.4.); die sich ergebenden Kurven sind fast identisch. Die Gesamtmenge der Fettkörpergly-

kogenphosphorylase nimmt während des 5. Larvenstadiums von etwa 100 auf 2000 bis 3000 U zu und folgt innerhalb der Freßphase dem Verlauf einer Wachstumskurve.

Während der Freßphase des 4. und des 5. Larvenstadiums beträgt der prozentuale Anteil der aktiven Form an der Gesamtposphorylase des Fettkörpers weniger als 10 %; ähnlich niedrige Aktivitäten werden auch in der Pharatpuppen- und Puppenzeit gefunden. Im Laufe der Freßphase liefert die Nahrung die Substrate des Kohlenhydratstoffwechsels, z.B. für den oxidativen Stoffwechsel, Glykogen-, Trehalose- und Chitinsynthese. Ein Abbau des Fettkörperglykogens ist deshalb in dieser Zeit nicht notwendig. Bei Säugern ist ein niedriger Prozentsatz aktiver Phosphorylase unbedingt notwendig, um überhaupt Glykogensynthese auftreten zu lassen (HERS, 1976); möglicherweise liegen bei Insekten ähnliche Verhältnisse vor. Die Intensität des Stoffwechsels ist während der Freßphase recht hoch, was durch hohen Sauerstoffverbrauch und hohe Kohlendioxidproduktion dokumentiert wird; in der Pharatpuppen- und Puppenzeit wird der Stoffwechsel von *Manduca sexta* auf ein Drittel bis ein Sechstel des höchsten Wertes der Freßphase des 5. Stadiums reduziert. Während der Puppenzeit von *Manduca sexta* bleibt die Phosphorylase des Fettkörpers aktivierbar (SIEGERT und ZIEGLER, 1981).

Während der späten Larvalentwicklung von *Manduca sexta* wird die Phosphorylase zweimal deutlich aktiviert. Die erste Aktivierung erfolgt während der Häutung vom 4. zum 5. Larvenstadium, die zweite während der Wanderphase, wenn die Larven einen geeigneten Platz zur Verpuppung suchen. Die Tiere können während der Häutung mit Sicherheit für 25 h keine Nahrung aufnehmen, da sie in dieser Zeit die Kutikula des alten, zu klein gewordenen Exoskeletts ablösen und auch die Mundwerkzeuge, Vorder- und Enddarm häuten müssen. Die Kopfkapsel wird am 2. Tag des 4. Larvenstadiums etwa ab 17 Uhr (bzw. 5 h vor Beendigung der Lichtperiode des Tages) deutlich sichtbar abgelöst und 25 h später abgeworfen; etwa 3 h nach dem Abwurf der Exuvie beginnen die Larven zu fressen (REINECKE, BUCKNER und GRUGEL, 1980). Um 21 Uhr des 2. Tages (L 4) macht

der prozentuale Anteil der aktiven Phosphorylase etwa 30 % der Gesamtaktivität aus, sodaß das Enzym anscheinend relativ schnell aktiviert wird (eine ähnlich schnelle Erhöhung der Phosphorylaseaktivität tritt in hungernden Larven von *Manduca sexta* auf, s. 4.2.3.). 12 h später (3. Tag, L 4,9 Uhr) wird mit etwa 45 % der höchste Wert gefunden. Wenige Stunden nachdem die Kopfkapsel abgeworfen worden ist, ist auch das Enzym mit Werten unter 30 % wieder teilweise inaktiviert. Die kurzfristige Aktivierung der Fettkörperglykogenphosphorylase während der Häutung wird möglicherweise durch den eintretenden Hunger hervorgerufen und durch ein Peptid der Cc gesteuert (ZIEGLER, 1979). Durch Entnahme der Cc sollte eine Beteiligung dieser Organe an der Phosphorylaseaktivierung untersucht werden, doch war eine Cardiacectomy bei Larven des 4. Stadiums nicht möglich, ohne die Tiere stark zu schädigen.

Die Larven sind beim Häutungsvorgang vorübergehend körperlich recht aktiv, da sie die enge Exuvie wie einen Strumpf ausziehen müssen, ohne besondere Extremitäten benutzen zu können. Diese körperliche Aktivität kann jedoch nicht für die Phosphorylaseaktivierung verantwortlich gemacht werden, da sie erst am Ende der Häutungsphase auftritt und dann auch nur insgesamt 1 min dauert (REINECKE, BUCKNER und GRUGEL, 1980).

Die Messungen der Atmung zeigen, daß im Laufe der Häutung der Stoffwechsel drastisch gesenkt wird; dies ist wohl notwendig, um in den mindestens 25 h ohne Futteraufnahme nicht alle Körperreserven mobilisieren zu müssen. Trotzdem wird Glykogen verstärkt abgebaut, um den reduzierten Stoffwechsel aufrecht zu erhalten zu können. Möglicherweise wird Glykogen abgebaut, um Substrate für die Chitinsynthese bereitzustellen (ZALUSKA, 1959), doch wird dafür im Gegensatz zu *Bombyx mori* nur ein kleiner Bruchteil verwendet.

Am Vormittag des 5. Tages des letzten Larvenstadiums, wenn die Glykogenphosphorylase noch weitgehend inaktiv ist, befinden sich die Larven bereits mehrere Stunden in der Wanderphase und haben dann bereits etwa 10 h keine Nahrung mehr zu sich genommen. Hunger hat in diesem Entwicklungsabschnitt entweder keine Bedeutung für die Phosphorylaseaktivierung oder wirkt sich nicht

so rasch aus. Erst einen halben Tag später sind 35 % aktive Phosphorylase vorhanden, weitere 12 h später sogar 40 %. Bereits am 5. Tag des Stadiums ist der Sauerstoffverbrauch der Tiere im Vergleich zum Vortag auf die Hälfte zurückgegangen, sodaß auch hier die Stoffwechselintensität stark abgenommen hat und noch weiter zurückgeht. Während der Wanderphase könnte die körperliche Aktivität die Phosphorylaseaktivierung hervorrufen.

Versuche mit cardiectomierten, allatectomierten wandernden Larven brachten keine eindeutige Entscheidung über die mögliche Beteiligung der Cc an der auftretenden Stimulierung der Phosphorylase, da das Enzym in diesen Versuchen nicht auf 30 %, sondern nur auf 15 bis 18 % aktiviert wurde. Obwohl in allen Versuchsgruppen etwa gleiche Meßwerte gefunden wurden, kann daraus nicht der Schluß gezogen werden, daß eine Beteiligung der Cc an der Enzymaktivierung nicht vorliegt. Dieses unbefriedigende Ergebnis kann auch nicht durch Fluktuationen des zeitlichen Verlaufs der Phosphorylaseaktivierung erklärt werden, da Tiere zu verschiedenen Zeiten innerhalb der Wanderphase untersucht wurden, die Meßwerte jedoch keinen deutlichen Unterschied aufweisen.

Der leichte, aber signifikante Anstieg der aktiven Phosphorylase während der Puppenhäutung scheint nur auf den Häutungsvorgang beschränkt zu sein. Was zur Aktivierung des Enzyms führt, ist ungeklärt. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Phosphorylaseaktivität durch die Behandlung der Versuchstiere beeinflusst wurde. Die Pharatpuppen befinden sich bis zur Verpuppung in Holzblöcken; sie mußten mehrere Male inspiziert werden, um kurz nach der Häutung untersucht werden zu können. Die Tiere wurden dabei stets aus der Dunkelheit ans Licht gebracht. Es ist nicht auszuschließen, daß diese Störung die leichte Aktivierung der Phosphorylase hervorrufen könnte.

Während der beiden kräftigen Phosphorylaseaktivierungen treten auch erniedrigte Gesamtzuckerkonzentrationen in der Hämolymphe auf; andererseits wird die Phosphorylase nicht immer dann aktiviert, wenn ein Absinken der Zuckerkonzentration in der Hämolymphe zu beobachten ist (s. Freßphase des 5. Larvenstadiums). Es ist deshalb wahrscheinlich, daß das Absinken der Gesamtzuckerkonzen-

tration der Hämolymphe nicht zu einer Aktivierung der Phosphorylase im Fettkörper führt und daß dabei andere Mechanismen eine Rolle spielen. Die Aktivierung der Glykogenphosphorylase führt stets zu einer Abnahme der Glykogenmenge im Organ. Die Gesamtmenge der aktiven Phosphorylase soll im Zusammenhang mit den Veränderungen des Glykogengehalts im Fettkörper diskutiert werden.

Bei *Philosamia ricini* sind die Aktivitäten der aktiven Phosphorylase während der Larvalhäutungen und nach dem Spinnen des Kokons im Gegensatz zu den Freßphasen der Larvenstadien jeweils am höchsten (PANT und KUMAR, 1979); während der Puppenhäutung tritt keine Aktivierung auf. Diese Ergebnisse sind nur mit größter Vorsicht zu diskutieren (Aktivitätsmessung des Enzyms nach Homogenisation des Gesamttieres in glasdestilliertem Wasser und Angaben der aktiven Phosphorylase nur in spezifischen Aktivitäten), sie unterstützen jedoch die Befunde der vorliegenden Arbeit. PANT und KUMAR (1979) fanden, daß die Glykogenmenge des Gesamttieres dann abnimmt, wenn die spezifische Aktivität der aktiven Phosphorylase ansteigt. Auch bei *Bombyx mori* kann eine Aktivierung der Phosphorylase vermutet werden, da bei diesem Schmetterling während der letzten Larvalhäutung das Gesamtkörperglykogen auf weniger als 10 % des Ausgangswertes abnimmt (ZALUSKA, 1959).

Der Glykogengehalt des gefriergetrockneten Fettkörpers von *Manduca sexta* beträgt während des betrachteten Zeitraumes der Larvalentwicklung stets zwischen 10 und 30 %. Besonders hoch sind die Anteile jeweils vor einer Aktivierung der Glykogenphosphorylase. Etwa 250 bis 300 µg Glykogen/mg Trockengewicht sind vor Beginn der letzten Larvalhäutung und der Wanderphase vorhanden. Während der Häutung (L 4 - L 5) geht bei *Manduca sexta* der Gesamtglykogengehalt des Fettkörpers um 2,7 mg auf 1,2 mg zurück. Im Laufe der letzten Larvalhäutung von *Bombyx mori* nimmt das Glykogen um etwa 9 mg auf 1 mg pro Tier ab (ZALUSKA, 1959). ZALUSKA beobachtete, daß dieser Abbau in der Mitte der Häutungsperiode auftritt, wenn gleichzeitig Chitin synthetisiert wird. Er schloß aus diesen Ergebnissen, daß die aus dem Glykogen abgebaute Glucose für die Chitinsynthese

benutzt wird. Bei *Manduca sexta* sind die Verhältnisse ähnlich, doch ist die Menge des abgebauten Glykogen und des synthetisierten Chitin geringer.

Manduca sexta nimmt während des letzten Larvenstadiums mit der Diät etwa 1.5 g Kohlenhydrate auf; aus dieser Menge kann leicht die Zunahme des Fettkörperglykogen von 2 mg (1. Tag) auf ca. 110 mg (5. Tag) bestritten werden. Vom 5. zum 6. Tag des Stadiums gehen innerhalb von 24 h etwa 17 mg Fettkörperglykogen (Aktivierung der Phosphorylase) und 8.5 mg Hämolymphezucker verloren. Das Fettkörperglykogen nimmt vom 6. zum 7. Tag wieder zu; die dazu benötigte Glucosemenge stammt wohl aus den Hämolymphezuckern, da die Gesamtmenge an Kohlenhydraten in Fettkörper und Hämolymphe konstant bleibt. In der Freßphase des 5. Larvenstadiums von *Bombyx mori* nimmt die Glykogenmenge des Gesamttiers bis zum Tag vor dem Spinnen des Kokons ebenfalls zu (dieser Entwicklungsabschnitt entspricht bei *Bombyx mori* etwa der Wanderphase von *Manduca sexta*) (ZALUSKA, 1959).

Interessant ist, wie die Verhältnisse von abgebautem Glykogen zur gemessenen katalytischen Potenz der aktiven Phosphorylase im Fettkörper während der Phasen mit erhöhter Enzymaktivität liegen. Es muß allerdings bemerkt werden, daß die folgenden Werte nur grobe Überschlagsrechnungen sein können, da die zugrunde liegenden zeitlichen Veränderungen der Glykogenwerte und der Phosphorylaseaktivitäten nicht genau bekannt sind.

Während der letzten Larvalhäutung von *Manduca sexta* beträgt die zwischen Tag 2 und Tag 3 des 4. Larvenstadiums abgebaute Glykogenmenge etwa 14.7 μmole Glucose, während die aktive Glykogenphosphorylase etwa 14.8 μmole innerhalb von 24 h abbauen könnte. Anders liegt das Verhältnis in den wandernden Larven. Etwa 105 μmole Glucose werden in 24 h abgebaut, während die aktive Phosphorylase etwa 860 μmole , also mehr als achtmal soviel, abbauen könnte. Die vorhandene Aktivität würde ausreichen, die gesamte Glykogenmenge des Fettkörpers (630 μmole Glucose) in weniger als 24 h abzubauen. Die Aktivität der aktiven Phosphorylase *in vivo* liegt demnach etwa um den Faktor 10 niedriger als *in vitro*. Dieses Ergebnis deutet auf grundlegende Unterschiede in der Effektivität der

Glykogenphosphorylase des Fettkörpers während der letzten Larvalhäutung und der Wanderphase von *Manduca sexta*. Eine Erklärung für die Diskrepanz kann nicht gegeben werden.

In den Puppen beider Geschlechter nimmt die Glykogenmenge des Fettkörpers ab. Dies kann in den Männchen nur teilweise durch den Rückgang des Fettkörpertrockengewichtes infolge von Histolyse erklärt werden. Bei den Weibchen nimmt das Fettkörpertrockengewicht im fraglichen Zeitraum nicht ab. Um den gefundenen Glykogenabbau hervorzurufen, reichen in den Männchen etwa 25 %, in den Weibchen 15 % der gemessenen enzymatischen Aktivität der aktiven Glykogenphosphorylase aus.

In den Männchen von *Bombyx mori* nimmt die Glykogenmenge pro Tier vom Zeitpunkt des Spinnens bis zur Verpuppung um etwa 50 %, in den Weibchen um etwa 25 % ab. In weiblichen Puppen tritt dann wieder eine Zunahme auf; ZALUSKA (1959) erklärt diesen Effekt durch die Synthese von Glykogen aus Fettreserven. Diese Erklärung ist sehr unwahrscheinlich, da bei Insekten bisher kein Glyoxylatzyklus gefunden wurde. Bei *Hyalophora cecropia* nimmt während des Spinnens des Kokons der Glykogengehalt der Gesamttiere wohl infolge von körperlicher Aktivität rasch ab (BADE und WYATT, 1962), steigt jedoch nach der Verpuppung wieder an. Glucose, die vor der Verpuppung aus Chitin freigesetzt wurde, wird wahrscheinlich in Fettkörperglykogen eingebaut; diese Aussage geht auf Versuche mit radioaktiv markierter Glucose zurück (BADE und WYATT, 1962). In *Hyalophora cecropia* wird nach der Puppenhäutung anscheinend auch Glucose in Lipide umgewandelt (BADE und WYATT, 1962), was im Gegensatz zu der oben zitierten Theorie von ZALUSKA (1959) steht.

PANT und KUMAR (1979) stellten bei *Philosamia ricini* fest, daß der Glykogengehalt der Tiere pro Gramm Frischgewicht jeweils zwischen den Larvalhäutungen ansteigt, während der Häutungen jedoch stets abnimmt. Eine klare Korrelation zu den Veränderungen der aktiven Phosphorylase konnte ebenfalls beobachtet werden (s.o.).

Alle Beispiele der Literatur und die in dieser Arbeit vorgelegten Ergeb-

nisse zeigen, daß zwischen den Häutungs- und Spinn- bzw. Wanderphasen der Schmetterlingslarven und dem Glykogengehalt der Gesamttiere oder des Fettkörpers ein Zusammenhang besteht. In den Freßphasen der Larvenstadien wird Glykogen als Reservekohlenhydrat aufgebaut und während der oben genannten Phasen teilweise abgebaut, um Bedürfnisse des Stoffwechsels zu decken. In dieses Stoffwechselschema paßt sich der Wechsel von Aktivierung und Inaktivierung der Fettkörperglykogenphosphorylase bei *Manduca sexta* sehr gut ein.

Wenn die Fettkörperglykogenphosphorylase während der späten Larvalentwicklung von *Manduca sexta* aktiviert ist, werden erniedrigte Hämolymphezuckerkonzentrationen gefunden. Werden aber erniedrigte Konzentrationen in der Hämolymphe gemessen, ist die Phosphorylase nicht immer aktiviert; so z.B. während der starken tagesperiodischen Fluktuationen der Hämolymphegesamtzuckerkonzentration während der Freßphase des 5. Larvenstadiums (s.o.). Im Gegensatz dazu scheint eine Kopplung zwischen der Höhe der Hämolymphezuckerkonzentration und der Aktivierung der Fettkörperglykogenphosphorylase in adulten Tieren von *Manduca sexta* allerdings ohne Vermittlung eines Hormons der Cc vorzuliegen (SIEGERT, 1980).

Die in der vorliegenden Untersuchung für *Manduca sexta* gefundenen Konzentrationen der Gesamtzucker in der Hämolymphe entsprechen recht gut den Werten, die JUNGREIS, JATLOW und WYATT (1973) für Larven des 5. Stadiums von *Hyalophora cecropia* gewannen, die auf einer synthetischen Diät aufgezogen worden waren.

DAHLMAN (1973) analysierte die Trehalosekonzentrationen der Hämolymphe von *Manduca sexta* während des 5. Larvenstadiums mit einer kombinierten Trehalase-Glucostat-Methode. Obwohl Growe (1980) feststellte, daß die Hämolymphe von *Manduca sexta* eine Komponente enthält, die die Glucose-Oxidase hemmt, wurden für die Anfangsphase des 5. Larvenstadiums mit 10 bis 18 mg Trehalose/ml (DAHLMAN, 1973) mehr als 50 % höhere Werte als in der vorliegenden Untersuchung gefunden. In der Folgezeit nahmen die Konzentrationen ab und lagen am 3. und 4. Tag des Stadiums mit Werten von etwa 12 mg Trehalose/ml z.T. deutlich niedriger

(DAHLMAN,1973) als in der vorliegenden Arbeit.Die Freßphase des 5. Larvenstadiums von *Manduca sexta* untersuchte DAHLMAN (1975) erneut und ermittelte mit derselben Methode etwa 50 % niedrigere Konzentrationen als in der vorherigen Arbeit (DAHLMAN,1973).

In der vorliegenden Untersuchung wurden für die Pharatpuppen- und Puppenzeit von *Manduca sexta* hohe Hämolymphezuckerkonzentrationen nachgewiesen. Zur Zeit der Puppenhäutung beträgt die Konzentration etwa 18 mg Trehalose/ml. JUNGREIS (1978) gab für Tiere eines ähnlichen Entwicklungsstadiums mit etwa 12 mg Trehalose/ml einen deutlich niedrigeren Meßwert an.Extrem niedrige Trehalosekonzentrationen der Hämolymphe fand DAHLMAN (1975) für die Pharatpuppenzeit von *Manduca sexta*;mit weniger als 3.5 mg Trehalose/ml wurden viermal niedrigere Konzentrationen als in der vorliegenden Arbeit gefunden.

Interessant ist,daß Larven von *Manduca sexta*,die auf einer synthetischen Diät gezogen wurden,etwa 100 % höhere Trehalosekonzentrationen aufweisen als Tiere, die mit natürlichem Futter ("Burley"-Tabak,*Nicotiana tabacum*) aufgezogen wurden (DAHLMAN,1975).Auch bei *Hyalophora cecropia* weisen Tiere, die ihre natürliche Nahrung (*Prunus serotina*) fressen,z.T. wesentlich geringere Hämolymphezuckerkonzentrationen auf,als mit synthetischer Diät gefütterte Larven (JUNGREIS,JATLOW und WYATT,1973).In *Bombyx mori* (gezogen mit Maulbeerblättern-*Morus niger*) beträgt die Gesamtzuckerkonzentration kurz vor dem Spinnen des Kokons etwa 5 bis 6 mg/ml (SAITO,1963) und liegt damit etwa 50 % niedriger als in vergleichbaren Larven von *Manduca sexta*.

In Diapausepuppen von *Manduca sexta* liegt die Gesamtzuckerkonzentration der Hämolymphe mit ca. 15 mg Trehalose/ml in den Männchen etwas höher, in den Weibchen mit 12.5 mg/ml etwas niedriger als am 3. Tag nach der Puppenhäutung.Im Vergleich zu diesem Zeitpunkt sind die Konzentrationen in pharatadulten Tieren von *Manduca sexta* mit Werten von über 20 mg/ml fast verdoppelt; im gleichen Zeitraum nimmt das Hämolympfvolumen etwa um die Hälfte ab (SIEGERT,1980).

Die insgesamt pro Tier vorhandene Hämolymphezuckermenge nimmt während

der Freßphase des letzten Larvenstadiums von *Manduca sexta* von etwa 5 mg auf insgesamt 60 mg zu. Ein Vergleich der Fettkörperglykogen- und Hämolymphezuckermengen für die ersten drei Tage der vier Tage dauernden Freßphase zeigt, daß in dieser Zeit mehr Trehalose in der Hämolymphe als Glykogen im Fettkörper vorhanden ist. Am 4. Tag und in der Folgezeit des Stadiums macht die Trehalosemenge etwa 50 % des Fettkörperglykogens aus. Während des ersten Teils des Larvenstadiums stellt also die Hämolymphe den größeren Kohlenhydratspeicher dar, in der Folgezeit ist es dann der Fettkörper.

In der Hämolymphe von Puppen befinden sich etwa 30 mg Trehalose. Pharat-adulte Tiere enthalten 16 bis 18 mg, adulte Tiere von *Manduca sexta* je nach Alter und Ernährungszustand dagegen 5 mg oder weniger in der Hämolymphe. Diese Unterschiede in den Hämolymphekohlenhydratmengen sind vor allem auf Veränderungen des Hämolympfvolumens zurückzuführen, da sich die jeweiligen Konzentrationen nur wenig unterscheiden.

Die Bestimmung der Glucosekonzentration der Hämolymphe von *Manduca sexta* muß nach Enteiweißung durch Perchlorsäure mit der Hexokinase-Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Methode durchgeführt werden (s.o.). Es sei deshalb darauf hingewiesen, daß die diskutierte Literatur mit teilweise beträchtlichen Fehlern behaftet sein könnte.

Die Hämolympheglucosekonzentration von *Manduca sexta* ist während der späten Larvalentwicklung starken Veränderungen unterworfen. Hohe Werte sind am Ende des 4. und Anfang des 5. Larvenstadiums vorhanden. Während der Häutung, wenn also die Tiere kein Futter aufnehmen können, fällt die Konzentration auf ein Drittel des Ausgangswertes ab; die Gesamtglucosemenge der Hämolymphe geht in dieser Zeit etwa auf die Hälfte zurück. Eine physiologische Bedeutung für das langsame Absinken der Glucosekonzentration während der Freßphase des 5. Larvenstadiums kann zur Zeit nicht angegeben werden. Es fällt jedoch auf, daß am Beginn der Freßphase die Menge des Glykogen im Fettkörper und der Trehalose in der Hämolymphe nur langsam und vom 2. zum 5. Tag sehr rasch zunimmt.

Möglicherweise ist also die Höhe der Glucosekonzentration in diesem Entwicklungsabschnitt Spiegelbild einer hohen Glucoseaufnahme aus der Nahrung und einer geringen Glucoseentnahme aus der Hämolymphe.

Während des 4. Larvenstadiums von *Manduca sexta* sind maximal etwa 0.5 mg Glucose pro Hämolympfvolumen vorhanden, 5 bis 10 % der Zuckermenge in der Hämolymphe sind also Glucose; in der Freßphase des 5. Larvenstadiums sind es mit 1 mg 2.5 bis 10 %. Im Verhältnis von Glucose zu Trehalose scheinen sich entwicklungsbedingte Unterschiede zu ergeben.

Während der Pharatpuppen- und Puppenzeit sind die Glucosekonzentrationen mit Werten von 100 bis 200 $\mu\text{g/ml}$ und die Gesamtmengen mit 200 bis 400 μg Glucose pro Hämolympfvolumen recht niedrig. Diese Werte sprechen dafür, daß hohe Glucosekonzentrationen nur während einer Freßphase auftreten und durch aus dem Darm aufgenommene Moleküle aufrechterhalten werden. Die kurz vor der Puppenhäutung auftretende leichte Erhöhung des Glucosespiegels könnte aus der Hydrolyse des beim Chitinabbau (s.u.) freiwerdenden N-Acetylglucosamin resultieren (ZALUSKA, 1959).

DAHLMAN (1973 und 1975) gab für das 5. Larvenstadium von *Manduca sexta* widersprüchliche Glucosekonzentrationen der Hämolymphe an. Die Konzentrationsangaben in der ersten Veröffentlichung (DAHLMAN, 1973) stimmen z.T. mit den hier angegebenen Werten für die Anfangsphase des Stadiums recht gut überein. In der Folgezeit des Stadiums sinken die Glucosekonzentrationen wesentlich schneller ab, als in der vorliegenden Arbeit beschrieben. DAHLMAN (1975) berichtete im Vergleich zu (1973) mehr als 50 % niedrigere Werte und fand überraschenderweise während der Pharatpuppenzeit die höchsten Glucosekonzentrationen in der Hämolymphe. Möglicherweise erhielt DAHLMAN diese Werte, weil der Inhibitor der Glucose-Oxidase (s.o.) in der Hämolymphe in unterschiedlichen Konzentrationen vorliegt. Die Ergebnisse für die Pharatpuppenzeit (DAHLMAN, 1975) sind physiologisch nicht erklärbar, da selbst bei aktivierter Fettkörperglykogenphosphorylase in geschnürten Abdomen von *Manduca sexta* die Glucosekonzentration der Hämolymphe nicht erhöht wird (GROWE, 1980). Die unter diesen Be-

dingungen abgebauten Glucoseeinheiten werden wahrscheinlich sofort bei der Trehalosesynthese verbraucht. Andererseits werden bei hohen Glucosekonzentrationen in der Hämolymphe diese Moleküle schnell aus der Hämolymphe entnommen und in die Glykogen- bzw. Trehalosesynthese eingespeist.

Nach 50 Tagen Diapause beträgt die Hämolympheglucosekonzentration in *Manduca sexta* weniger als 100 µg/ml, was einer Gesamtmenge von etwa 150 µg Glucose pro Hämolymphe entspricht (SIEGERT und ZIEGLER, 1981). Der prozentuale Anteil der Glucose an der Gesamtzuckerkonzentration liegt bei 0.5 bis 1.0 %, sodaß sich also die Verhältnisse während der Diapause im Vergleich zum Beginn der Puppenzeit kaum verändern.

Die Konzentrationen der intrazellulären Zucker bezogen auf das Fettkörperrockengewicht zeigen nur geringe Veränderungen, liegen jedoch in Larven der Freißphase des 5. Stadiums höher als während der Pharatpuppenzeit. Nimmt man an, daß 50 % des Fettkörperfrischgewichts Zellwasser sind (JUNGREIS und WYATT, 1972), dürften die tatsächlichen intrazellulären Zuckerkonzentrationen während der Freißphase des letzten Larvenstadiums von *Manduca sexta* mit Werten zwischen 10 und 14 mg Trehalose/ml in etwa den Hämolymphewerten entsprechen oder höher liegen, wären aber in der Pharatpuppen- und Puppenzeit mit 6 bis 10 mg/ml wesentlich niedriger. Die Ergebnisse von JUNGREIS und WYATT (1972), die an Wandernden Larven und Puppen von *Manduca sexta* (nach 60 Tagen Diapause) gewonnen wurden, sind recht gut mit den hier geschilderten Werten für die Pharatpuppen- und Puppenzeit vergleichbar. In Wandernden Larven liegen die Zuckerkonzentrationen der Hämolymphe mit 70 mM Glucose/ml fast doppelt so hoch wie im Fettkörper (47 mM Glucose/ml). In der hier vorliegenden Arbeit wurde für das Verhältnis Intrazelluläre Zuckerkonzentration/Hämolymphezuckerkonzentration ein Wert von 0.7 gefunden, JUNGREIS und WYATT (1972) berichteten 0.56. Zwischen Freißphase und Pharatpuppen- und Puppenzeit von *Manduca sexta* besteht wohl ein Unterschied, was die intrazellulären Zuckerkonzentrationen und die Fähigkeit betrifft, diese Konzentrationen zu regulieren. Wenn Larven Futter aufnehmen, kön-

nen die Zucker möglicherweise frei in den Fettkörper eindringen und ihn verlassen; dagegen wird in der Pharatepuppen- und Puppenzeit wahrscheinlich ein Gradient zwischen den niedrigen Konzentrationen im Fettkörper und den hohen Konzentrationen der Hämolymphe aufrechterhalten (JUNGREIS und WYATT, 1972).

Die Gesamtmenge der freien intrazellulären Zucker im Fettkörper wächst während der Freßphase des 5. Stadiums von *Manduca sexta* an und folgt in etwa dem Kurvenverlauf des Fettkörperglykogens. Die Gesamtmenge der intrazellulären Zucker macht im Höchstfall 10 % des Glykogens aus und stellt somit nur eine geringe Kohlenhydratreserve dar.

Über die Natur der intrazellulären Zucker kann nichts ausgesagt werden, es ist jedoch zu vermuten, daß das Verhältnis Glucose/Trehalose in etwa dem der Hämolymphe entspricht (s.o.).

Die Chitinsynthese scheint während der zweiten Hälfte des 4. Larvenstadiums von *Manduca sexta* bis zur Häutung gering zu sein, da sich der Chitosangehalt der Tiere nur um 1 mg (12.5 % des Ausgangswertes) erhöht. Kurz nach der Häutung sind insgesamt 8.8 mg Chitosan vorhanden, wovon 1.4 mg (16 %) mit der Exuvie abgeworfen werden. Diese Exuvie wird manchmal - jedoch nicht immer - nach der Ecdyse aufgefressen.

ZALUSKA (1959) konnte zeigen, daß während der letzten Larvalhäutung von *Bombyx mori* die Chitinmenge drastisch erhöht wird, während der Glykogengehalt der Tiere abnimmt. Die Zunahme der Chitinmenge und die Abnahme des Fettkörperglykogens sind bei *Manduca sexta* wesentlich geringer. Es kann jedoch angenommen werden, daß auch bei *Manduca sexta* ein Teil des Glykogens während der Häutungen für die Chitinsynthese aktiviert wird.

Nach der Häutung (L 4 - L 5) werden bei *Manduca sexta* innerhalb von 15 h etwa 3.2 mg Chitosan synthetisiert, das sind mehr als 40 % des Ausgangswertes. Während der Freßphase des 5. Stadiums liefert die aufgenommene Nahrung genügend Substrate, um die massive Chitinsynthese zu decken. Nachdem die Larven das Fressen eingestellt haben (Tag 5) nimmt die Chitosanmenge nur noch langsam zu.

Während des 4. Tages des 5. Larvenstadiums von *Manduca sexta* löst ein Ecdysonpeak in der Hämolymphe (BOLLENBACHER, SMITH, GOODMAN und GILBERT, 1981) die Wanderphase aus und bewirkt, daß die Epidermiszellen ihren Larvalcharakter verlieren und Puppencharakter bekommen (RIDDIFORD, 1981). Von diesem Zeitpunkt an nimmt die Chitosanmenge der Kutikula bis zum 7. Tag nur noch um 5 mg/24 h zu. Eine direkte Beeinflussung des Chitinstoffwechsels durch Ecdysteron konnte von KIMURA (1973) in geschnürten Abdomen von *Bombyx mori* demonstriert werden; allerdings untersuchte KIMURA (1973) nicht die Chitinsynthese, sondern fand durch Ecdysteron eine Stimulierung der Chitinase.

Nach der Apolyse, 7. Tag des Stadiums (WIELGUS und GILBERT, 1978), nimmt der Chitosangehalt der Tiere innerhalb von 36 bis 48 h um mehr als 50 mg ab. Nach der Verpuppung enthalten die Tiere nur noch 15 mg Chitosan, die abgeworfene Exuvie etwa 10 mg. Die für die Anfangsphase der Puppenzeit gefundenen Meßwerte entsprechen wahrscheinlich nicht den tatsächlichen Chitosanmengen, da die Proben bräunlich wie die natürliche Puppenkutikula gefärbt sind und wohl nicht extrahierte Proteine enthalten. Die Larvenkutikula liefert nach Aufarbeitung weißliches Chitosan (s. 3.2.3.).

HETTICK und BADE (1979) ermittelten für *Manduca sexta* mit derselben, aber verkürzten Extraktionsmethode um etwa 10 % niedrigere Werte als in der vorliegenden Untersuchung. Diese Autoren fanden bereits nach der Wanderphase einen Rückgang des Chitosangehaltes. Die Körpergewichte von *Manduca sexta* (HETTICK und BADE, 1979) sind den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen vergleichbar, nur in der Pharatuppenzeit wurden hier 0.5 bis 1 g schwerere Tiere benutzt. Die festgestellten Unterschiede im Chitosangehalt können jedoch nicht allein durch die unterschiedlichen Körpergewichte erklärt werden. Die späte Pharatuppenzeit mit Häutung und die frühe Puppenzeit wurden von HETTICK und BADE (1979) nicht untersucht. Der Rückgang des Chitosangehaltes der Tiere vor der Puppenhäutung ist sehr gut mit einem dramatischen Ansteigen der Chitinaseaktivität in der Kutikula von *Manduca sexta* etwa 20 bis 40 h vor der Häutung korreliert (BADE, 1975). Eine starke Abnahme des kutikulären Chitins zum gleichen

Zeitpunkt tritt auch bei *Hyalophora cecropia* auf; die abgebauten Moleküle werden teils für die Chitinneusynthese teils für Glykogen- und Lipidsynthese verwendet (BADE und WYATT, 1962). Für *Manduca sexta* läßt sich ein Ansteigen des Fettkörperglykogens zum entsprechenden Zeitpunkt nicht nachweisen. Auch die Lipidmenge des Organs wächst nicht an den Tagen 8 und 9, sondern bereits vorher (Tag 6 bis Tag 8). Da die hier für *Manduca sexta* diskutierten Ergebnisse nicht an denselben Tieren gewonnen wurden, besteht die Möglichkeit, daß Diskrepanzen in den Kurvenverläufen durch unterschiedliche Entwicklungsgeschwindigkeiten zustande kommen. Die diskutierten Unterschiede zwischen *Hyalophora cecropia* und *Manduca sexta* können aufgrund der hier beschriebenen Ergebnisse nicht erklärt werden.

Ein Teil der vor der Puppenhäutung abgebauten Chitinmenge wird höchstwahrscheinlich beim Aufbau der Puppenkutikula benutzt; dies wurde von BADE und WYATT (1962) an *Hyalophora cecropia* demonstriert. Diese Autoren schreiben der Kutikula auch die Rolle einer zusätzlichen Quelle für Reservestoffe zu. Ein weiteres Speicherorgan neben Fettkörper und Hämolymphe könnte bei *Hyalophora cecropia* deshalb von Bedeutung sein, weil die adulten Tiere keine Nahrung aufnehmen können. Ein Teil der in der Kutikula als Chitin abgelagerten Kohlenhydratmenge wird möglicherweise bei der Puppenhäutung in den Fettkörper transferiert (BADE und WYATT, 1962). Eine ähnliche Funktion kann für die Kutikula von *Manduca sexta* angenommen werden, obwohl die adulten Tiere dieser Art Nahrung in Form von Blütensäften aufnehmen können. Die Rolle der Kutikula als Kohlenhydratspeicher wird auch dadurch verdeutlicht, daß die Chitosanmenge in wandernden Larven mindestens so groß wie die Glykogenmenge des Fettkörpers ist, aber nur 50 % dieser Menge in der Puppenzeit gebraucht werden.

Bei *Bombyx mori* nimmt der Chitingehalt der Tiere kurz vor der Puppenhäutung ebenfalls dramatisch ab (ZALUSKA, 1959). ZALUSKA berichtete weiterhin, daß während der Adultentwicklung maximal 50 % der höchsten Chitinmenge der Larven vorhanden sind. Auf *Manduca sexta* übertragen würde das bedeuten, daß etwa 50 bis 60 mg Chitosan in der Puppenkutikula vorhanden sein müßten; dieser

Wert wird am 3. Tag nach der Puppenhäutung gefunden.

Die Lipidkonzentration der Hämolymphe liegt während des 4. und bis zum 5. Tag des 5. Larvenstadiums von *Manduca sexta* mit Werten unter 2 mg/ml recht niedrig und ist kaum Fluktuationen unterworfen. Bis zum 8. Tag verfünffacht sich die Konzentration. Dieser Vorgang kann nur zu einem geringen Teil durch die Verringerung des Hämolympfvolumens erklärt werden (s.o.). Lipide müssen aus dem Fettkörper in die Hämolymphe abgegeben werden, um den Konzentrationsstieg zu erreichen. CHANG und FRIEDMAN (1971) gaben die Lipidkonzentrationen in Larven von *Manduca sexta* mit 1.45 mg/ml an; dieser Wert entspricht den in der vorliegenden Arbeit berichteten sehr gut. In der Hämolymphe von Puppen fanden CHANG und FRIEDMAN mit 10.4 mg Lipid/ml etwas höhere Werte als in der vorliegenden Arbeit berichtet werden. In Larven von *Manduca sexta* sind 55 % der Hämolymphlipide Diacylglycerine, jeweils 10 % entfallen auf Tri- und Monoacylglycerine, sowie 25 % auf freie Fettsäuren; Diacylglycerine und freie Fettsäuren sind in Puppen unverändert, Monoacylglycerine überhaupt nicht und Triacylglycerine zu etwa 30 % vertreten (CHANG und FRIEDMAN, 1971). Larven von *Prodenia eridania* enthalten mit etwa 3.2 mg/ml (BUCK, 1953) *Manduca sexta* vergleichbare Hämolymphlipidkonzentrationen, während in der Wachsmotte, *Galleria mellonella*, Konzentrationen von über 20 mg/ml gefunden wurden (WLODAWER und WISNIESKA, 1965); dieses Insekt ist insgesamt sehr reich an Lipiden.

Die Hämolymphlipidkonzentrationen in Diapausepuppen von *Manduca sexta* liegen mit 5 bis 6 mg/ml nur etwas niedriger als in jungen Puppen (6 bis 8 mg/ml). Ähnliche Werte werden in Diapausepuppen von *Hyalophora cecropia* gefunden (SIEGERT, unveröffentlichte Werte). In adulten Tieren von *Manduca sexta* liegen die Lipidkonzentrationen der Hämolymphe zwischen 20 und 40 mg/ml (ZIEGLER und SCHULZ, 1982); dies könnte daran liegen, daß die Lipide für den Stoffwechsel der adulten Tiere eine größere Rolle spielen als in Larven.

Während der Freßphasen des 4. und 5. Larvenstadiums von *Manduca sexta* sind in der Hämolymphe stets weniger als 5 mg Lipide vorhanden. Der höchste

Wert im hier betrachteten Entwicklungszeitraum wird mit 18 mg erst am 8. Tag, also während der Pharatpuppenzeit, gefunden. 10 bis 15 mg Lipide werden in jungen Puppen und in Diapausepuppen gefunden. Wegen des geringen Hämolympfolumens enthalten adulte Tiere trotz sehr hoher Konzentrationen nur 8 bis 10 mg Lipide in der Hämolymphe. Diese Unterschiede resultieren wahrscheinlich daraus, daß der Fettkörper in verschiedenen Entwicklungsstadien Lipidreserven anlegt, die dann in anderen Stadien wieder an die Hämolymphe abgegeben werden; sie resultieren jedoch auch aus unterschiedlichen Entnahmeraten in anderen Organen.

Am Ende des 4. Larvenstadiums sind etwa 30 % des Fettkörper-trockengewichts Lipide; am Anfang der Puppenzeit und nach 50 Tagen Diapause steigt der Anteil auf 45 bis 50 %, in jungen adulten Tieren von *Manduca sexta* sind es sogar 50 bis 70 % (SIEGERT und ZIEGLER, 1981). Während der Freßphase des letzten Larvenstadiums nimmt die Lipidgesamtmenge des Fettkörpers von etwa 3 bis 4 mg (Tag 3, L 4) auf etwa 185 mg (Tag 5, L 5) stark zu. Selbst in der Pharatpuppenzeit, wenn die Tiere keine Nahrung aufnehmen, wächst die Lipidmenge noch weiter an (s.o.). Es ist unbekannt, aus welcher Quelle die dafür notwendigen Substanzen kommen. Während der Freßphase des 5. Larvenstadiums nehmen die Tiere etwa 225 mg Lipide auf. Diese Menge reicht zwar dafür aus, die Lipidreserven des Fettkörpers bis zum 5. Tag des Stadiums und einen Teil der oxidierten Lipide zu stellen; doch alles, was über den genannten Wert von 185 mg Lipid an Fettkörperreserven hinausgeht, muß aus Kohlenhydraten bzw. Aminosäuren umgewandelt werden. Vom 5. Tag des letzten Stadiums bis zum 2. Tag nach der Puppenhäutung nimmt die Gesamtmenge der Kohlenhydrate - Glykogen (Fettkörper) + Trehalose (Hämolymphe) + Chitosan (Kutikula) - in beiden Geschlechtern um etwa 120 mg Glucoseäquivalente ab; im gleichen Zeitraum steigt der Lipidgehalt des Fettkörpers in den Männchen um etwa 40 mg, in den Weibchen um 90 mg. Die Veränderungen der betreffenden Komponenten stimmen zeitlich nicht genau überein (s.o.), doch könnte die neugebildete Lipidmenge weitgehend aus diesen Substanzen stammen. Auch in diesem Zusammenhang kann wie schon erwähnt der Kutikula eine sehr

wichtige Rolle als Kohlenhydratspeicher zukommen. Die so ermittelten Werte lassen sogar noch den Verbrauch von Kohlenhydraten für den oxidativen Stoffwechsel zu. Diese Überlegungen werden durch Ergebnisse, die BADE und WYATT (1962) für *Hyalophora cecropia* ermittelten, unterstützt (s.o.).

Der Fettkörper in Larven von *Manduca sexta* enthält bezogen auf das Frischgewicht etwa 10 %, der der Puppen etwa 25 % Lipide (CHANG und FRIEDMAN, 1971). Bei einem Zellwasseranteil im Fettkörper von etwa 50 % (JUNGREIS und WYATT, 1972) würden diese Werte, umgerechnet auf Trockengewicht, in etwa den in der vorliegenden Arbeit berichteten entsprechen. Etwa 80 % der Fettkörperlipide sind bei *Manduca sexta* Triacylglycerine, 10 % Diacylglycerine; in den Rest teilen sich Monoacylglycerine und freie Fettsäuren (FFA) (CHANG und FRIEDMAN, 1971).

CHANG und FRIEDMAN (1971) berichteten ebenfalls entwicklungsbedingte Unterschiede bei der spontanen Lipidfreisetzung aus dem Fettkörper von *Manduca sexta in vitro*. Am Ende der Larvalphase wird wenig Lipid freigesetzt (da im Fettkörper vor allen Dingen Reserven aufgebaut werden); während der Puppenzeit ändert sich dieses Bild. Der Fettkörper setzt Lipide, vor allem FFA, frei, da viel Energie für die Neuorganisation des adulten Tieres notwendig ist.

Die niedrigen Lipidkonzentrationen in Larven von *Manduca sexta* legen nahe, daß der Lipidstoffwechsel in diesem Entwicklungsabschnitt eine geringere Rolle als der Kohlenhydratstoffwechsel bzw. als in adulten Tieren spielt. Die Respiratorischen Quotienten zeigen jedoch eine gemischte Oxidation von Kohlenhydraten und Lipiden, teilweise sogar ausschließlich Lipidveratmung an (s.u.). Gleichzeitig zeigen die hohen Lipidanteile im Fettkörper, daß große Reserven für nachfolgende Entwicklungsabschnitte (Adultentwicklung und Adultleben) angelegt werden. Die Hämolymphe hat wahrscheinlich deshalb so niedrige Lipidkonzentrationen, weil die zur Verfügung stehenden Fette sofort in Reserven eingebaut bzw. sie sofort verbraucht werden. Erst in späteren Entwicklungsabschnitten gibt der Fettkörper verstärkt Lipide an die Hämolymphe ab.

Der Sauerstoffverbrauch von *Manduca sexta* ($\text{ml O}_2 \times \text{h}^{-1} \times \text{Tier}^{-1}$) nimmt während der letzten Larvalhäutung ab, was anzeigt, daß in dieser Zeit der Stoffwechsel reduziert ist. Das erscheint auch sinnvoll zu sein, da die körpereigenen Reserven für die mehr als 25 stündige Häutungsperiode bei hoher Stoffwechselintensität nicht ausreichen. Während der Freßphase des letzten Larvenstadiums nimmt bei *Manduca sexta* die Intensität der Atmung wieder zu, was auch eine Zunahme der Gesamtstoffwechselintensität bedeutet. Nach Beendigung der Freßphase sinkt die Atmungsintensität wieder ab. Da dieser Entwicklungsschritt unter der Kontrolle von Ecdyson steht, könnte dieses Hormon auch an der Regulation der Stoffwechselintensität beteiligt sein. Ecdyson beeinflusst z.B. auch den Stoffwechsel von Epidermiszellen während der Larven-Puppen-Umwandlung von *Manduca sexta* nachhaltig (RIDDIFORD, 1981). In der Pharatpuppen- und Pharatadultzeit ist ein reduzierter Stoffwechsel notwendig, da für etwa 25 Tage keine Nahrung aufgenommen werden kann. Einen Rückgang der Atmung nach der Puppenhäutung von Diapausetieren wurde auch von BRADFIELD und DENLINGER (1980) für *Manduca sexta* erwähnt. Die zeitlichen Veränderungen des Sauerstoffverbrauchs während der Larval- und Adultentwicklung von *Manduca sexta* entsprechen denen von *Galleria mellonella* recht gut (SEHNAL und SLAMA, 1966), allerdings liegen die Absolutwerte wegen der geringeren Körpermasse von *Galleria mellonella* etwa um den Faktor 10 niedriger.

Am Ende des 4. und bis zum 2. Tag des 5. Larvenstadiums werden wohl Lipide und Kohlenhydrate zu etwa gleichen Teilen im Stoffwechsel von *Manduca sexta* oxidiert; anschließend werden mehr oder ausschließlich Lipide veratmet.

Während der Pharatpuppenzeit steigen die Werte für die Respiratorischen Quotienten langsam an, sodaß mehr Kohlenhydrate als Lipide verbraucht werden. Der Beginn der Pharatadultzeit ist durch RQs von 1 und darüber gekennzeichnet, möglicherweise werden in dieser Zeit Kohlenhydrate (z.B. Abbauprodukte des Chitins) in Lipide umgewandelt. Biochemische Befunde zu diesem Problem liegen nicht vor.

Aus den Werten für die Kohlendioxidfreisetzung kann die jeweils pro

Zeiteinheit oxidierte Substanzmenge berechnet werden. Da aus den Respiratorischen Quotienten nicht immer genau die im oxidativen Stoffwechsel veratmete Art der Substanzen erkannt werden kann ($RQ = 1$ = Kohlenhydrate; $RQ = 0.7$ = Lipide), werden die berechneten Substanzmengen für beide Extremfälle und die gemessenen Respiratorischen Quotienten in Klammern angegeben. Vom 2. zum 3. Tag des 4. Larvenstadiums (also kurz vor der letzten Larvalhäutung) werden etwa 23 mg (130 μ mole) Glucose bzw. 14 mg (49 μ mole) Stearinsäure pro 24 h oxidiert; zu diesem Zeitpunkt werden wohl beide Substanzen gleichzeitig oxidiert ($RQ = 0.8$ bis 0.85). Im gleichen Zeitraum gehen in Hämolymphe und Fettkörper 3.5 mg (19.4 μ mole) Glucose bzw. 1.4 mg (4.9 μ mole) Stearinsäure verloren. Diese Mengen können nur etwa 25 % des betrachteten Verbrauchs decken, wobei berücksichtigt werden muß, daß auch für die Chitinsynthese Glucose (etwa 1 mg) notwendig ist. Diese Betrachtung zeigt, daß Substanzen aus anderen Organen der Larven (z.B. aus dem Darminhalt) verbraucht werden müssen, doch sollten auch diese Mengen im Vergleich zu den Fettkörperreserven gering sein. Andererseits sind die genauen Zeitkurven für die Veränderungen der Lipid- und Kohlenhydratmengen und der Kohlendioxidproduktion nicht bekannt. ZIEGLER (unveröffentlichte Werte) beobachtete, daß die Kohlendioxidproduktion innerhalb von 10 h nach Bildung der Kopfkapsel auf etwa ein Drittel des Ausgangswertes abnimmt. Für die oben genannten Überschlagsrechnungen können jedoch nur die Durchschnittswerte für den 2. und 3. Tag (jeweils 9.00 Uhr) des 4. Larvenstadiums herangezogen werden.

Während des 5. Larvenstadiums wird der größte Umsatz am 3. und 4. Tag mit 157 mg (871 μ mole) Glucose oder 93 (327 μ mole) Stearinsäure pro 24 h verzeichnet ($RQ = 0.7$). Am Ende des Stadiums werden etwa gleiche Mengen wie am Anfang oxidiert. Bei *Hyalophora cecropia* wurde für die Zeit nach dem Spinnen des Kokon aufgrund der Veränderungen des Trockengewichts der Gesamttiere berechnet, daß gleichzeitig Kohlenhydrate und Lipide oxidiert werden (BADE und WYATT, 1962).

Die während des 5. Larvenstadiums von *Manduca sexta* gewonnenen Daten

für Sauerstoffverbrauch und Kohlendioxidproduktion pro Tier stellen die höchsten für diese Art ermittelten Werte dar. Während der Adultentwicklung wurden für beide Geschlechter am 7. Tag nach der Verpuppung die niedrigsten Werte gemessen; ein Verbrauch von 11.3 mg (63 μ mole) Glucose oder 6.7 mg (24 μ mole) Stearinsäure pro 24 h wurde gefunden ($RQ = 1$). Im Vergleich zu den größten Larven ist das Körpergewicht der pharatadulten Tiere von *Manduca sexta* um etwa 50 % zurückgegangen, während der Stoffwechsel auf etwa 7 % des entsprechenden Wertes abgenommen hat. In Diapausepuppen von *Manduca sexta* werden etwa 0.8 mg (3 μ mole) Stearinsäure oder 1.3 mg (7 μ mole) Glucose pro 24 h umgesetzt ($RQ = 0.7$); dieser Wert liegt etwa um den Faktor 10 niedriger als der Verbrauch während der Pharatadultzeit. Nach der Adulthäutung oxidieren ruhende Tiere innerhalb von 24 h etwa 42 mg (233 μ mole) Glucose oder 25 mg (88 μ mole) Stearinsäure ($RQ = 0.85$). Die in Fettkörper und Hämolymphe zusammen vorhandene Lipidmenge liegt in beiden Geschlechtern über 100 mg, sodaß der Bedarf für mehrere Tage Hunger gedeckt ist. Dagegen enthalten die beiden Organe in Männchen nur 9.5 mg und in Weibchen 14 mg Glucose; diese Mengen würden nicht einmal für 24 h reichen.

Diese Zusammenstellung zeigt die Relationen des Stoffverbrauches der verschiedenen Entwicklungsabschnitte zueinander, wobei die großen Larven von *Manduca sexta* innerhalb von 24 h die größten Substanzmengen oxidieren. Betrachtet man jedoch die Stoffwechselintensität, also den Verbrauch pro Gramm Körpergewicht, so findet man die höchsten Werte am 1. und 2. Tag des 5. Larvenstadiums. In diesem Zeitraum werden im Fettkörper nur geringe Mengen an Glykogen und Lipid aufgebaut. In der Pharatpuppenzeit liegen die Werte ungefähr bei einem Sechstel des höchsten Wertes der Freißphase des letzten Stadiums. Innerhalb der ersten 10 Tage der Pharatadultzeit geht dieser Wert nochmals um 50 % zurück und erreicht die niedrigsten Werte. Nur in Diapausepuppen liegt die Stoffwechselrate um den Faktor 10 niedriger. Diapausepuppen von *Manduca sexta* haben also im Vergleich zu den Larven des 5. Stadiums mit dem höchsten Umsatz einen

um den Faktor 100 erniedrigten Stoffwechsel. Ruhende adulte Tiere von *Manduca sexta* setzen etwa 50 % des höchsten Wertes der Larven des 5. Stadiums um. Fliegende Tiere dürften einen weitaus höheren Stoffwechsel aufweisen. Diese Ergebnisse für *Manduca sexta* entsprechen den Verhältnissen bei *Hyalophora cecropia* sehr gut (SCHNEIDERMAN und WILLIAMS, 1953).

5.2. Steuerung des Stoffwechsels in hungernden Larven des 5. Stadiums von *Manduca sexta*

Die Ergebnisse, die für die späte Larvalentwicklung von *Manduca sexta* gewonnen wurden, zeigen, daß Hunger Veränderungen im Kohlenhydratstoffwechsel hervorrufen könnte. Dagegen scheint der Lipidstoffwechsel nur geringe Beeinflussung zu erfahren. Die Auswirkungen von Hunger auf beide Stoffwechselsysteme wurden trotzdem in Larven des 5. Stadiums von *Manduca sexta* untersucht.

Ein Problem stellte die Auswahl der Versuchstiere dar. Das letzte Larvenstadium holometaboler Insekten läßt sich in eine Freß- und eine Vorbereitungsphase für die Verpuppung einteilen, während der keine Nahrung aufgenommen wird. Die Freßphase kann in zwei charakteristische Phasen unterteilt werden (CALVEZ und FOURCHE, 1980). Hungern Larven in der ersten, der notwendigen Freßphase, so führt dies zum Tode; dagegen kommt es nach einigen Tagen zu einer normalen Häutung, wenn Larven in der zweiten, der fakultativen Freßphase, hungern. Verwendet man Tiere der notwendigen Freßphase, entwickeln sich die Tiere nicht weiter und außerdem steht sehr wenig Untersuchungsmaterial zur Verfügung, auch wenn man die relativ großen Larven des 5. Stadiums von *Manduca sexta* (etwa 1 g) verwenden würde. In diesem Fall ist es unmöglich, adäquate Kontrolltiere zu finden; diese Tiere müßten fressen, aber gleichzeitig in ihrer Entwicklung nicht voranschreiten. Benutzt man Tiere der fakultativen Freßphase, so können z.B. Hormonausschüttungen (Ecdyson oder Juvenilhormon) in Hunger- und Kontrolltieren nicht zum gleichen Zeitpunkt auftreten oder die Hormontiter nicht vergleichbar sein. Das wurde z.B. in hungernden Larven von *Manduca sexta* (Körpergewicht 3 bis 3.5 g) beobachtet; die Juvenilhormonkonzentration der Hämolymphe stieg innerhalb von 24 h Hunger um mehr als das Doppelte, während sie in gefütterten Kontrolltieren fiel (NIJHOUT, 1975 b).

Um genügend Untersuchungsmaterial zur Verfügung zu haben, wurden Tiere vom 3. Tag des 5. Larvenstadiums ausgewählt; diese Tiere haben ein Körpergewicht von 6 bis 7 g. Die Hämolymphtiter von Ecdyson und Juvenilhormon während

der späten Larvalentwicklung von *Manduca sexta* sind sehr gut untersucht (BOLLENBACHER, SMITH, GOODMAN und GILBERT, 1981; RIDDIFORD, 1981), sind jedoch nicht für Larven bekannt, die am 3. Tag des 5. Stadiums für 48 h auf Hunger gesetzt werden. Die Ergebnisse von NIJHOUT und WILLIAMS (1974) zeigen jedoch, daß sich diese Larven bereits jenseits der Determination zur Ausschüttung des Prothoracotropen Hormons befinden. Am Morgen des 5. Tages (also nach 48 stündiger Versuchsdauer) befanden sich hungrige und gefütterte Larven, von wenigen Ausnahmen abgesehen, in der Wanderphase. Das bedeutet, daß die Juvenilhormonkonzentration sowohl in hungrigen als auch in den gefütterten Larven gleich null sein dürfte und daß sich die Ecdysontiter in beiden Versuchsgruppen wohl entsprechen.

Die Larven treten, wie schon erwähnt, während der Hungerperiode in eine Wanderphase ein, in der sie einen geeigneten Platz zur Verpuppung suchen. Diese Phase beginnt etwa 36 h nach Versuchsbeginn; zu diesem Zeitpunkt treten auch die gefütterten Kontrolltiere in diese vorprogrammierte Hungerphase ein, die etwa 25 Tage andauert und die Pharatuppenzeit, Puppenzeit und die Adultentwicklung einschließt.

Die Meßwerte, die von gefütterten Kontrolltieren stammen, stimmen im allgemeinen mit den Werten recht gut überein, die im ersten Teil der vorliegenden Untersuchung für die entsprechenden Tage (3, 4 und 5) des 5. Larvenstadiums gefunden worden waren. Da die Messungen sich über mehrere Jahre erstreckten, zeigt diese Tatsache, daß die Zuchtbedingungen sehr konstant waren und die synthetische Diät stets zuverlässig zubereitet wurde. Allerdings wurden in gefütterten Kontrolltieren durchgehend etwa 30 % höhere Fettkörper trockengewichte gefunden. Natürlich wirkt sich dieser Unterschied auch in den Werten aus, die durch Multiplikation mit dem Fettkörper trockengewicht entstanden sind (z.B. Gesamtglykogenmenge, Gesamtphosphorylaseaktivität im Fettkörper etc.). Dieser Unterschied dürfte vor allem darin begründet sein, daß die beiden Meßreihen von zwei verschiedenen Personen zu verschiedenen Zeiten aufgenommen wurden.

Vor Versuchsbeginn wurden die Larven nach ihren Körpergewichten ausge-

wählt; auf diese Störung reagierten sie zumindest vorübergehend mit der Einstellung der Futteraufnahme (eigene Beobachtungen; REINECKE, BUCKNER und GRUGEL, 1980). Notiert wurde der Zeitpunkt der Futterentnahme aus den Tierbehältern, so daß die tatsächliche Dauer des Hungerns etwa 5 bis 20 min länger als die nominelle sein dürfte.

Das Körpergewicht der Tiere zu Versuchsbeginn entspricht mit etwa 6.35 g genau den Durchschnittswerten für den 3. Tag des 5. Larvenstadiums, doch nehmen die Gewichte der Kontrolltiere schneller zu. Der Hunger bewirkt, daß die Larven innerhalb von 48 h etwa 1 g Körpergewicht (16 % des Ausgangswertes) bzw. 0.3 ml (15 %) Hämolympfvolumen verlieren. Das Fettkörper Trockengewicht nimmt in hungernden Larven ebenfalls ab; dieses Ergebnis zeigt, daß die Reserven dieses Organs während der Hungerphase angegriffen werden.

Während die Proteinkonzentration der Hämolymphe in den Kontrolltieren kontinuierlich zunimmt, bleibt der Wert in den hungernden Larven für 24 h konstant. Der Proteingehalt des Fettkörpers verändert sich ebenfalls kaum. In den hungernden Larven steigt die Proteingesamtmenge der Hämolymphe während der zweiten 24 h um etwa 10 mg an (48 h). Da der Fettkörper im gleichen Zeitraum nur 7 mg Protein verliert, muß die Differenz aus anderen Organen gedeckt werden (z.B. durch das Insecticyanin der Epidermiszellen; RIDDIFORD, 1981). Da die Veränderungen in Fettkörper und Hämolymphe gehungerter und gefütterter Larven während der zweiten 24 h des Versuchs ähnlich sind, kann geschlossen werden, daß trotz der unterschiedlichen Absolutmengen und der unterschiedlichen Stoffwechselsituationen wahrscheinlich die gleichen entwicklungsbedingten Programme ablaufen.

Während der Hungerphase ist die Lipidkonzentration der Hämolymphe in etwa den Werten der Kontrolltiere vergleichbar, so daß der Lipidstoffwechsel des Fettkörpers weiterhin auf Anhäufung von Reserven eingestellt sein dürfte

(s.u.). Es zeigte sich jedoch, daß in der Hämolymphe von Kontrolltieren nach 24 h mit etwa 4 mg fast doppelt soviel Lipide wie in hungernden Tieren vorhanden sind. Die Konzentrationserhöhungen während der zweiten 24 h sind sowohl in hungernden als auch in Kontrolltieren auf Lipidfreisetzung aus dem Fettkörper zurückzuführen.

Das Ansteigen des Lipidgehaltes des Fettkörpers von 60 auf 70 % nach 24 h Hunger zeigt, daß vor allem andere Komponenten aus dem Fettkörper entnommen werden. Die Veränderungen in den Kontrolltieren sind äußerst gering und die prozentualen Anteile der Lipide am Trockengewicht des Fettkörpers betragen etwa 55 bis 60 %. In diesen Tieren nimmt die Lipidmenge in 48 h jedoch um den Faktor 3 auf mehr als 300 mg pro Fettkörper zu. Die Hungertiere verbrauchen in den ersten 24 h keine Fettkörperlipide; erst während des zweiten Tages der Hungerperiode nimmt die Lipidmenge um etwa 10 mg ab, wovon nur etwa 2.5 mg zur Erhöhung der Lipidkonzentration der Hämolymphe herangezogen werden, 7.5 mg können also verstoffwechselt werden. Für die leichte Erhöhung der Lipidkonzentration in den Kontrolltieren müssen aus Fettkörper oder Darm etwa 3 mg an die Hämolymphe abgegeben werden. Dies zeigt, daß die Erhöhung der Lipidkonzentration in Hungertieren entwicklungsbedingt und nicht auf die Einwirkung von Hunger zurückzuführen ist. Während in Larven von *Manduca sexta* innerhalb einer 24 stündigen Hungerphase nur geringfügige Veränderungen der Lipidkonzentration in der Hämolymphe auftreten, verdoppelt sich diese Konzentration in adulten Tieren von *Locusta migratoria* innerhalb der gleichen Zeit (CHEESEMANN und GOLDSWORTHY, 1979); auch in hungernden, adulten Tieren von *Manduca sexta* steigt die Hämolymphlipidkonzentration stark an (ZIEGLER, unveröffentlichte Werte). Der Lipidstoffwechsel scheint deshalb in hungernden, adulten Tieren der Wanderheuschrecke und *Manduca sexta* eine wichtigere Rolle als in hungernden Larven von *Manduca sexta* zu spielen.

Die Trehalosekonzentration der Hämolymphe liegt in hungernden Larven von *Manduca sexta* meist über den entsprechenden Kontrollen, doch sind zu keinem

Zeitpunkt signifikante Unterschiede festzustellen. Die Veränderungen in Hungertieren sind wohl auf die erhöhte Phosphorylaseaktivität und auf das leicht abnehmende Hämolympfvolumen zurückzuführen. Interessant ist, daß am Beginn der Hungerperiode keine Erniedrigung der Trehalosekonzentration auftritt. Eine solche Veränderung hätte den Anlaß für die Phosphorylaseaktivierung (s. 4.2.3.) darstellen können. Wenn die Phosphorylase nach 48 h in hungernden Tieren wieder vollständig inaktiviert ist, werden in Hunger- und Kontrolltieren etwa gleiche Trehalosekonzentrationen gefunden. Die Trehalosemengen in hungernden Larven bleiben während der 48 h mit etwa 25 mg mehr oder weniger konstant. In den Kontrollen wird die Zuckermenge der Hämolymphe auf etwa 40 mg erhöht.

Neben der stationären Hämolymp hkonzentration ist die Dynamik des Trehalosepools interessant. Für Larven des 5. Stadiums von *Bombyx mori* wies SAITO (1963) neben einem Rückgang der Trehalosekonzentration nach 15 h auf 70 % des Ausgangswertes auch Unterschiede im Trehaloseturnover zwischen hungernden und gefütterten Tieren nach. In gefütterten Tieren des 5. Larvenstadiums beträgt die Halbwertszeit von Trehalose in der Hämolymphe etwa 6 h, wurden die Tiere vor den Messungen 5 h gehungert, beträgt sie 10.5 h. Eine Reduktion der Stoffwechselintensität in hungernden Larven ist offensichtlich. Dies wird auch durch die absinkende Atmung in hungernden Larven von *Manduca sexta* bestätigt (s. 4.2.6.).

Während die Trehalosekonzentration in der Hämolymphe von Hungertieren fast unverändert bleibt, findet ein deutlicher Rückgang des Glucosespiegels *

* Die Anfangskonzentration der Glucose mit etwa 250 µg/ml erscheint im Vergleich zu den nachfolgenden Kontrollwerten und den entsprechenden Werten in Abb. 37 recht niedrig zu sein. Dieser Effekt könnte mit der Auswahl der Versuchstiere und der damit verbundenen Störung der Freßaktivität zusammenhängen (s.o.). Nach einiger Zeit, wenn die Versuchstiere im Brutschrank wieder Futter aufnehmen können und nicht mehr gestört werden, weisen sie bis zu dreimal höhere Glucosekonzentrationen der Hämolymphe auf.

statt. Nach 6 h wird in Hungertieren ein Plateau von etwa 50 $\mu\text{g/ml}$ erreicht. Selbst die Kontrolltiere, die nach Eintritt in die Wanderphase die Futteraufnahme eingestellt haben (48 h), weisen immerhin noch viermal höhere Glucosekonzentrationen auf, obwohl auch sie sich etwa 8 bis 12 h in einer Hungerperiode befinden dürften. Auf 50 $\mu\text{g/ml}$ fällt die Glucosekonzentration der Hämolymphe weder während der letzten Larvalhäutung noch nach der Wanderphase in der Pharatpuppenzeit von *Manduca sexta*. Dies zeigt, daß zwischen der untersuchten Hungerperiode und der Zeit nach der Wanderphase, in der ja vorprogrammiert keine Nahrung aufgenommen wird, auch stoffwechselphysiologische Unterschiede existieren. Möglicherweise fällt die Glucosekonzentration in Hungertieren so stark ab, weil die Entnahme aus der Hämolymphe höher als in den Pharatpuppen ist. Die hohe Glucosekonzentration während der Freßphase wird wohl nur durch Moleküle, die aus dem Darm eindiffundieren und somit aus der Nahrung stammen, aufrechterhalten.

Die Glucosekonzentration der Hämolymphe könnte die Rolle übernehmen, deutlich zu machen, daß eine Hungersituation eingetreten ist. Wenn die Glucosekonzentration unter einen bestimmten, kritischen Wert abgesunken ist, könnte eine Sequenz in Gang gesetzt werden, die zur Aktivierung der Phosphorylase führt. Dieser Aspekt soll an anderer Stelle diskutiert werden (s.u.). Außerdem könnten die Veränderungen der Glucosekonzentration auch die Futteraufnahme steuern. Während einer Phase der Futteraufnahme wird eine hohe Glucosekonzentration in der Hämolymphe erreicht, in einer folgenden Ruhephase fällt die Konzentration unter einen kritischen Wert und die Larven könnten wieder veranlaßt werden, Futter aufzunehmen. Ähnliche Ergebnisse wurden für Hunde gewonnen (RUSSEK, LORA-VILCHIS und ISLAS-CHAIRES, 1980).

Ein Kernstück der vorliegenden Arbeit stellt die Frage dar, ob die Fettkörperglykogenphosphorylase während der Hungerphase durch ein Peptid der Cc aktiviert wird. Während des 3. und 4. Tages des Stadiums ist bei *Manduca sexta* eine Regulation der Phosphorylaseaktivierung durch die Cc möglich, da das En-

zym innerhalb von 10 min nach Injektion eines Paares Cc auf 50 % (3. Tag) bzw. 35 % (4. Tag) aktiviert wird (ZIEGLER, in Vorbereitung).

In Hungertieren wird nach 3 h ein Spitzenwert von etwa 50 % aktiver Phosphorylase erreicht. Nach insgesamt 48 h ist das Enzym wieder vollständig inaktiviert. In hungernden Larven liegen die Aktivitäten der aktiven Phosphorylase also mehr als 24 h über den Kontrollen. Interessanterweise tritt jedoch dann eine Aktivierung des Enzyms nicht ein, wenn sie normalerweise innerhalb der Entwicklung auftreten müßte, nämlich während der Wanderphase der Larven. Wie die Aktivierung des Enzyms verhindert wird, kann zur Zeit nicht erklärt werden.

Sehr gute Hinweise dafür, ob ein Organ an der Regulation von Stoffwechselprozessen beteiligt ist, bieten Versuche, in denen das betreffende Organ aus dem Tier entnommen worden ist. Da nach Entnahme der Cc die Fettkörperglykogenphosphorylase innerhalb von 3 h Hunger nicht aktiviert wird, kann wohl festgestellt werden, daß diese Organe an der Aktivierung des Enzyms beteiligt sind. Die Ergebnisse des Ausschaltungsexperiments werden durch Substitutionsexperimente ergänzt, da nur Extrakte der Larvalen Cc, nicht der Ca, in cardiacectomierten, allatectomierten Larven von *Manduca sexta* die Phosphorylase aktivieren. Das Glykogenphosphorylase aktivierende Hormon (ZIEGLER, 1979) wird wohl von den Cc an die Hämolymphe abgegeben und zum Fettkörper, dem Zielorgan, transportiert.

In *Locusta migratoria* wurde zwar eine Erhöhung des Lipidspiegels der Hämolymphe nach ausgedehntem Hunger gefunden (MWANGI und GOLDSWORTHY, 1977), doch scheint bei diesem Insekt das Adipokinetische Hormon (AKH) nicht an der Freisetzung der Lipide aus dem Fettkörper beteiligt zu sein, da in der Hämolymphe hungernder Tiere genauso wenig AKH gefunden wurde wie in gefütterten Kontrollen (CHEESEMAM und GOLDSWORTHY, 1979). Dies ist überraschend, da in fliegenden Wanderheuschrecken, *Locusta migratoria*, die Erhöhung des Hämolymphlipidspiegels durch AKH bewirkt wird (CHEESEMAM und GOLDSWORTHY, 1979).

Da in cardiacectomierten Larven von *Manduca sexta* die Fettkörperglyko-

genphosphorylase nach 3 stündigem Hunger nicht aktiviert wird, kann ein Absinken der Hämolymphtrehalosekonzentration in diesen Tieren erwartet werden; dies konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Das Ergebnis könnte für eine Doppelrolle des Phosphorylase aktivierenden Peptids sprechen, das einerseits den Abbau der Glykogenreserven des Fettkörpers, andererseits aber auch die Aufnahme von Kohlenhydraten in andere Organe oder die Oxidation in einem anderen Organ steuern könnte. Eine solche Doppelrolle konnte für das AKH von *Locusta migratoria* demonstriert werden, da AKH neben der Lipidaktivierung im Fettkörper die Kohlenhydratoxidation im Flugmuskel stoppt und die Lipidoxidation stimuliert (ROBINSON und GOLDSWORTHY, 1974 und 1977). Eine Erhöhung der Kohlenhydratoxidation durch das Phosphorylase aktivierende Hormon scheint bei *Manduca sexta* jedoch nicht vorzuliegen (SIEGERT und ZIEGLER, 1982).

Um Hinweise darüber zu bekommen, ob der Rückgang der aktiven Phosphorylase bei anhaltendem Hunger an verminderter Sekretion des aktivierenden Hormons aus den Cc liegt, oder ob das Hormon in der Hämolymphe vorhanden ist, der Fettkörper aber nicht auf das Peptid anspricht, wurde in 24 und 48 h gehungerte Larven von *Manduca sexta* 1 Paar CcCa injiziert. Nach 24 h Hunger, wenn also die Tiere den 4. Tag des Stadiums erreicht haben und im Fettkörper etwa 20 % aktive Phosphorylase vorliegen, kann die Phosphorylase durch diese Behandlung innerhalb von 10 min voll aktiviert werden. Aus den in 24 h hungernden Larven vorliegenden 20 % aktiver Glykogenphosphorylase kann man schließen, daß in der Hämolymphe dieser Tiere wohl Hormon vorhanden ist, ohne daß man Angaben über die Höhe des Hormonspiegels machen kann. Die Fettkörperglykogenphosphorylase in 24 h hungernden Larven ist stärker aktivierbar als in entsprechenden gefütterten Larven (ZIEGLER, in Vorbereitung). Auch nach 48 stündigem Hunger ist die Phosphorylase von 5 auf etwa 50 % aktivierbar; dagegen ist in gefütterten wandernden Larven das Enzym durch 1 Paar Cc innerhalb von 10 min von etwa 25 bis 30 % auf etwa 50 % aktivierbar (ZIEGLER, in Vorbereitung). Da zu dieser Zeit in unbehandelten, gehungerten Larven sehr niedrige Phosphorylaseaktivitäten vorliegen (ca. 5 %), ist die Hämolymphe wahrscheinlich von Hormon befreit.

Man kann schließen, daß die Cc während der Hungerphase etwas länger als 24 h aktiv sein und das Phosphorylase aktivierende Peptid an die Hämolymphe abgeben dürften. Anschließend wird die Hormonausschüttung eingestellt und die Hämolymphe von Hormon befreit. Der Fettkörper bleibt während der gesamten Hungerperiode voll aktivierbar. Die Unterschiede in der Aktivierbarkeit der Glykogenphosphorylase in Hunger- und Kontrolltieren können zur Zeit nicht erklärt werden.

Da Larven am Beginn der Hungerperiode körperlich recht aktiv sind und nach Futter suchen, bestand die Möglichkeit, daß die Phosphorylaseaktivierung durch die körperliche Aktivität hervorgerufen werden könnte; diese Aktivität wurde durch TTX unterbunden. Da in hungernden, mit TTX paralyisierten Tieren die Fettkörperglykogenphosphorylase wie in unbehandelten und mit Zitratlösung injizierten Hungertieren aktiviert wird, kann ausgeschlossen werden, daß die Aktivierung in Zusammenhang mit der körperlichen Aktivität eintritt. ORCHARD und LOUGHTON (1981) berichten, daß 10^{-6} M TTX *in vitro* die Ausschüttung von AKH nach elektrischer Stimulation der Cc von *Locusta migratoria* verhindert. In der gleichen Konzentration löscht TTX Aktionspotentiale im glandulären Teil der Cc aus. Nach Injektion wird in der Hämolymphe von *Manduca sexta* eine TTX-Konzentration von etwa 37×10^{-6} M erreicht; im Gesamttier hat TTX eine Konzentration von etwa 12.5×10^{-6} M. Da diese Konzentration höher als die von ORCHARD und LOUGHTON (1981) benutzte ist, liegt die Interpretation nahe, daß TTX *in vivo* bei Larven von *Manduca sexta* die Ausschüttung des Phosphorylase aktivierenden Peptids nicht verhindert. Die Möglichkeit, daß TTX die Phosphorylase selbst aktiviert, wurde durch Injektion von TTX in geschnürte Abdomen ausgeschlossen.

Ebenso konnte die Möglichkeit ausgeschlossen werden, daß die allmähliche Leerung des Darmes in hungernden Larven zur Ausschüttung des Hormons aus den Cc führen könnte. Versuche, in denen Streckrezeptoren durch Durchtrennung des Nervensystems posterior vom Unterschlundganglion ausgeschaltet worden waren, konnten nicht durchgeführt werden, da die Tiere nach der Behandlung keine

Nahrung mehr aufnehmen. Deshalb wurde durch Verfütterung von 3 %igem Agar für einen gefüllten Darm gesorgt. In Larven, die reines Agar fressen, wird die Glykogenphosphorylase wie in hungernden Tieren aktiviert. Das Ausbleiben von Nährstoffen, also eine Hunger- bzw. Nährstoffmangelsituation, führt zur Aktivierung der Glykogenphosphorylase.

Da keine Streckrezeptoren in die Aktivierungssequenz einbezogen sind, sondern das Ausbleiben von Nährstoffen zur Enzymaktivierung führt, wurde dieser Aspekt genauer untersucht. Die Trehalosekonzentration der Hämolymphe sinkt in den ersten Stunden der Hungerphase nicht ab, sodaß die Aktivierung der Phosphorylase nicht durch Veränderungen dieses Parameters ausgelöst wird. Eine andere Möglichkeit besteht darin, daß die sinkende Glucosekonzentration zur Phosphorylaseaktivierung führen könnte.

Überraschend ist die Tatsache, daß die Glucosekonzentration der Hämolymphe fressender Larven von *Manduca sexta* der im Blut des Menschen (THEWS, MUTSCHLER und VAUPEL, 1980) und der Ratte (SHIKAMA, YAJIMA und UI, 1980) entspricht und etwa 5 mM (bzw. 0.6 bis 1 mg/ml) beträgt. Das Absinken der Glucosekonzentration soll beim Menschen von hypothetischen Glucoserezeptoren des Hypothalamus registriert werden. Dieses Organ kontrolliert seinerseits die Sekretion von Glukagon aus den A-Zellen des Pankreas (THEWS, MUTSCHLER und VAUPEL, 1980). Während beim Menschen die Glucosekonzentration Meß- und Regelgröße darstellen würde, würde sie bei *Manduca sexta* nur die Meßgröße sein. Die Regelgröße würde die Trehalosekonzentration sein, da die abgebauten Glucosemoleküle sofort für die Trehalosesynthese benutzt werden. Die Höhe der Glucosekonzentration in der Hämolymphe von *Manduca sexta* wird nicht aktiv reguliert, da die Fettkörperglykogenphosphorylase in hungernden Larven wieder inaktiviert wird, obwohl die Glucosekonzentration unverändert niedrig ist (24 h).

Die Injektion von Glucose in hungernde Larven von *Manduca sexta* führt zu einer signifikant geringeren Phosphorylaseaktivierung als in unbehandelten, hungernden Tieren. Diese Behandlung führt in den hungernden Larven zu unphysiologisch hohen Hämolymphezuckerkonzentrationen, setzt wohl auch die Aus-

schüttung des Hormons aus den Cc herab, da die Injektion von Cc-Extrakten das Enzym in diesen Tieren wieder aktiviert. Eine signifikante Verminderung der Phosphorylaseaktivierung nach Injektion von Trehalose ist nicht nachweisbar. Die resultierenden Trehalosekonzentrationen sind nach Trehaloseinjektion in hungernden Larven nach 3 h etwa verdoppelt und nach Glucoseverabreichung um ca. 30 % erhöht. Die Glucosekonzentration wird in hungernden, mit Glucose injizierten Larven erhöht, nicht nach Trehaloseinjektion. Die Ergebnisse zeigen, daß eine schnelle Entnahme der Trehalose aus der Hämolymphe nicht auftritt, da die Konzentration 2 h nach der ersten Injektion noch sehr hoch ist.

Interessanterweise ruft die Injektion von 1 Paar Cc in mit Glucose vorbehandelten Larven innerhalb von 10 min eine Aktivierung auf 80 % hervor, während in gefütterten Tieren nur etwa 40 % aktive Form erreicht werden. Bei der Injektion von Glucose werden weniger Kohlenhydrate verabreicht (insgesamt 66 mg Glucose) als in gefütterten Tieren aus der Nahrung in den Darm aufgenommen werden kann (etwa 120 mg Kohlenhydrate), sodaß wahrscheinlich nicht übermäßig hohe Kohlenhydratmengen für diesen Unterschied in der Aktivierbarkeit verantwortlich gemacht werden können.

Um unphysiologisch hohe Konzentrationen nach Glucoseverabreichung zu vermeiden, ist eine kontinuierliche Zufuhr notwendig; es wurde versucht, dies durch Verfütterung von Agar mit verschiedenen Kohlenhydraten zu erreichen. Die so verabreichte Kohlenhydratmenge hängt von der Freßaktivität der Versuchstiere ab; die tatsächlich in die Hämolymphe der Versuchstiere aufgenommene Menge ist unbekannt. Die Phosphorylaseaktivierung wird verhindert, wenn Larven 3 h mit Agar gefüttert werden, das 3.2 % Saccharose enthält. In diesem Fall werden durchschnittlich etwa 60 mg Saccharose (also jeweils etwa 30 mg Glucose und Fructose) in den Darm aufgenommen. Die hungernden, wie die mit reinem Agar gefütterten Tiere zeigen signifikant erniedrigte Glucosespiegel. Die Phosphorylaseaktivierung wird auch in diesem Versuch unterdrückt, das Ergebnis ist jedoch etwas unklar, da die Glucosekonzentration der Hämolymphe in etwa konstant gehalten wird, obwohl nur 30 mg Glucose zur Verfügung stehen. Mögli-

cherweise spielt die Fructosekonzentration ebenfalls eine Rolle oder Fructose wird in Glucose umgewandelt.

Die Verabreichung von Fructose allein verhindert ebenfalls eine Phosphorylaseaktivierung, jedoch ohne Aufrechterhaltung der Hämolympheglucosekonzentration. Deshalb könnte auch eine hohe Fructosekonzentration wirksam sein. Glucose allein ist natürlich in Bezug auf die Verhinderung der Phosphorylaseaktivierung ebenfalls wirksam, ohne jedoch seinerseits die Fructosekonzentration der Hämolymphe beeinflussen zu können.

Neben schon diskutierten Ergebnissen wird in mit Saccharose gefütterten Tieren auch die Fructosekonzentration konstant gehalten. Daraus läßt sich der Schluß ziehen, daß sowohl Glucose als auch Fructose an der Verhinderung der Phosphorylaseaktivierung beteiligt sein könnten.

Ein überraschendes Ergebnis erbrachte die Verfütterung von Trehalose. Obwohl in der Hämolymphe dieser Tiere weder die Fructose- noch die Glucosekonzentration erhöht ist, wird die Phosphorylase nicht aktiviert. Da ein Konzentrationsgradient zwischen Darminhalt (etwa 32 mg Trehalose/ml) und Hämolymphe (etwa 12 bis 14 mg/ml) vorliegen dürfte, dürfte auch ein gewisser Einstrom von Trehalose in die Hämolymphe gewährleistet sein. Daß in diesem Versuch die Fettkörperglykogenphosphorylase nicht aktiviert wird, kann also nicht mit der Wirkung von hohen Glucose-, Fructose- oder Trehalosekonzentrationen der Hämolymphe erklärt werden. Eine Erklärung dieses Ergebnisses ist zur Zeit nicht möglich, es läßt jedoch auch die Beteiligung von Glucose- und Fructosekonzentrationen der Hämolymphe an der Regulation der Sekretion des Phosphorylase aktivierenden Hormons aus den Cc unwahrscheinlich erscheinen.

Die Injektion von 6-Deoxy-D-Glucose (Endkonzentration 0.5 bis 1 mg/ml) in hungrige Larven von *Manduca sexta* verhindert die Aktivierung der Phosphorylase nicht. Es dürften keine spezifischen Rezeptoren für Glucose bzw. Fructose vorhanden sein, die die jeweiligen Konzentrationen in der Hämolymphe messen. Da die Deoxyfunktion in Stellung 6 die 6-Deoxy-D-Glucose davor schützt

phosphoryliert und damit verstoffwechselt zu werden, dürften wohl eher von diesen Kohlenhydraten abstammende Stoffwechselprodukte eine Rolle spielen. Es erscheint unwahrscheinlich zu sein, daß die Hydroxylfunktion der Glucose in Stellung 6 für eine Rezeptorbindung notwendig ist oder daß 6-Deoxy-D-Glucose in *Manduca sexta* doch verstoffwechselt werden könnte. Gegen eine Wirkung der Glucosekonzentration sprechen auch die Ergebnisse, die mit Fructose und Trehalose gefütterten Larven gewonnen wurden. Möglicherweise reicht es für eine Verhinderung der Phosphorylaseaktivierung aus, daß direkt verwertbare (also : phosphorylierbare) Kohlenhydrate dem Organismus zur Verfügung stehen.

Aus der Zeitkurve der Phosphorylaseaktivierung kann entnommen werden, daß innerhalb der ersten 3 h des Hungers etwa 18 mg Glucose aus dem Glykogen freigesetzt werden können, tatsächlich findet ein Rückgang um 3.3 mg statt. Auch wenn man berücksichtigt, daß in späteren Versuchen nach 3 h Hunger eine Aktivierung auf durchschnittlich 35 % erreicht wurde, kann die auftretende Diskrepanz nicht erklärt werden, da dann immer noch mehr als 13 mg Glucose freigesetzt werden würden. Während der gesamten 48 stündigen Hungerperiode könnte mit 220 mg Glucose die siebenfache Menge des anfänglich vorhandenen Glykogens abgebaut werden; in der erwähnten Zeitspanne gehen insgesamt nur 23.4 mg Glykogen verloren. Während des zweiten Tages der Hungerphase könnten 50 mg abgebaut werden, doch wurde nur eine Abnahme von 2.5 mg Glykogen gefunden. Auch während des Hungerns scheint die Phosphorylase - wie in der Wanderphase - nicht voll ausgelastet zu arbeiten.

Im Gegensatz zu den Kontrollen steigen die spezifischen Aktivitäten der Gesamtform der Fettkörperglykogenphosphorylase in hungernden Tieren kontinuierlich an und liegen nach 48 h fast doppelt so hoch wie in den Kontrolltieren. Betrachtet man die Gesamtaktivitäten pro Fettkörper, so zeigt sich, daß die Enzymaktivität in den hungernden Larven nur wenig verändert wird und mit etwa 1500 U pro Fettkörper fast konstant bleibt. Das bedeutet gleichzeitig, daß Proteine aus dem Fettkörper abgegeben oder abgebaut werden. Dadurch, daß sich die Gesamtphosphorylaseaktivität im Fettkörper von Hungertieren kaum verändert,

wird angezeigt, daß die Proteinreserven angegriffen werden und nicht unspezifisch der Proteingehalt des Fettkörpers vermindert wird. In den Kontrollen verdoppelt sich die Phosphorylase von 1500 auf etwa 3000 U pro Fettkörper innerhalb von 48 h. Im ersten Teil der vorliegenden Untersuchung wurden für den 5. Tag nur 2000 U pro Fettkörper gefunden. Nur in männlichen Puppen (2. Tag) sind ähnlich hohe Aktivitäten vorhanden (s. 4.1.4.). Dieser hohe Wert in den Kontrolltieren wird vor allem durch das hohe Fettkörpertrockengewicht verursacht (s.o.).

In beiden Versuchsgruppen läuft die Chitinsynthese in der Epidermis während der ersten 9 h mit gleicher Rate ab. Erst nach 24 h ist zum ersten Mal ein signifikanter Unterschied feststellbar. Interessant ist, daß die Chitinsynthese in der Kutikula der Hungertiere solange weiterläuft wie die Phosphorylase des Fettkörpers deutlich aktiviert ist. Ein Wirkungszusammenhang zwischen beiden Prozessen soll durch diese Feststellung jedoch nicht behauptet werden. Während der ersten 24 h der Hungerperiode nimmt der Chitosangehalt um etwa 19 mg zu, während der Fettkörper etwa 21 mg Glykogen verliert. Diese Menge wäre zur Deckung der Chitinsynthese ausreichend, doch steigt im gleichen Zeitraum die Hämolymphezuckermenge ebenfalls um 3.5 mg an. Zusätzlich dürfte ein Teil des abgebauten Glykogens auch im oxidativen Stoffwechsel verbraucht werden. Aus dieser Überschlagsrechnung geht hervor, daß mit Sicherheit auch Substrate, die z.B. in der Epidermis vorliegen, zur Chitinsynthese in hungernden Larven herangezogen werden dürften. Auch aus dem Darm werden noch für einige Zeit Substrate in die Hämolymphe übertreten. Ob die Chitinsynthese in hungernden Larven aus Ermangelung an Substraten oder aktiv durch Hormone gesteuert zum Erliegen kommt, kann aufgrund der vorliegenden Ergebnisse nicht entschieden werden.

Der Rückgang der Atmung in hungernden Larven ist möglicherweise keiner Steuerung unterworfen und kommt dadurch zustande, daß die Substrate, die direkt

für die Oxidation benutzt werden, abnehmen. Innerhalb von 3 h Hunger sinkt die Kohlendioxidproduktion der Tiere auf etwa 50 % des Kontrollwertes und bleibt dann zumindest für die nächsten 6 h konstant. In dieser Zeit ist die Fettkörperglykogenphosphorylase z.T. bis zu 50 % aktiviert. Aus diesen parallel verlaufenden Veränderungen könnte der Schluß gezogen werden, daß die abgebauten Kohlenhydrate zur Stabilisierung der Energiegewinnung (Oxidation) herangezogen werden. Die RQ-Werte dieses Zeitraums liegen in Hungertieren zwischen 0.62 und 0.74 und zeigen somit Lipidoxidation an. Eine Erklärung für diese Diskrepanz kann zur Zeit nicht gegeben werden; es ist jedoch möglich, daß nur ein bestimmtes Organ mit Kohlenhydraten versorgt werden muß, das in seiner Atmung nicht den RQ des Gesamttieres beeinträchtigt. Ein solches Organ ist wie bei den Säugern das Nervensystem (TREHERNE, 1960; STRANG und CLEMENT, 1980). Beim Menschen macht der Stoffwechsel des Gehirns etwa 20 % des Grundumsatzes aus. Möglicherweise ist die Atmung dieses Organs jedoch bei Insekten von einem Ausmaß, das die Werte für das Gesamttier nur geringfügig beeinflusst. Zu diesem Problemkreis liegen jedoch keine Untersuchungen vor.

Es ist bemerkenswert, daß die RQs hungernder Larven Lipidoxidation anzeigen, die Lipidmengen des Fettkörpers, dem größten Speicherorgan der Insekten, im gleichen Zeitraum jedoch keine Veränderungen zeigen.

Aus den Werten für die Kohlendioxidproduktion kann berechnet werden, daß die Larven während einer 48 stündigen Hungerphase etwa 68 mg (239 μ mole) Stearinsäure oder 127 mg (706 μ mole) Glucose oxidieren, wobei etwa 56 % auf die ersten 24 h entfallen. Die Kohlendioxidproduktion der Kontrolltiere liegt um mehr als das Doppelte höher; insgesamt werden in ihnen 152 mg (534 μ mole) Stearinsäure oder 288 mg (1600 μ mole) Glucose in 48 h oxidiert; davon entfallen etwa 54 % auf die ersten 24 h. Die biochemischen Untersuchungen von Fettkörper und Hämolymphe zeigen, daß innerhalb der ersten 24 h der Hungerperiode aus diesen Organen nur etwa 20 mg Kohlenhydrate und keine Lipide verloren gehen. Während des zweiten Tages der Hungerperiode werden 20 mg Lipide und keine Kohlenhydrate abgebaut. Diese Mengen reichen also nicht einmal aus, 50 % der Atmung

zu decken. Die Bilanz der Proteine in Fettkörper und Hämolymphe ist in der betrachteten Zeitspanne in etwa ausgeglichen, sodaß aus diesem Pool keine Substrate verbraucht werden. Insgesamt gesehen müssen große Kohlenhydrat- und Lipidmengen aus anderen Organen herangezogen werden, um die gefundenen Kohlendioxidfreisetzungen zu erklären. Der Darm entleert sich zwar während der Hungerphase, doch bleiben noch Nährstoffe in ihm zurück, die nach und nach in die Hämolymphe übertreten können und somit dem Stoffwechsel zugeführt werden. Zu diesem Aspekt können jedoch keine quantitativen Aussagen gemacht werden, da er in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurde. Es wäre daher sinnvoll, neben Veränderungen der einzelnen Substanzmengen in Fettkörper und Hämolymphe auch die im Gesamttier zu verfolgen.

Die Bewertung der Respiratorischen Quotienten ist schwierig, da die Meßwerte der Hunger- und Kontrolltiere nicht individuell bestimmt werden konnten, sondern aus den Durchschnittswerten für Sauerstoffverbrauch und Kohlendioxidproduktion verschiedener Meßreihen ermittelt werden mußten. Es läßt sich jedoch mit Sicherheit sagen, daß ein RQ von 1 (das würde ausschließlich Kohlenhydratoxidation bedeuten) nie festgestellt wurde. Im Gegensatz dazu liegen die RQs so, daß während der gesamten Hungerphase mehr Lipide als Kohlenhydrate oxidiert werden dürften. Die RQs, die niedriger als 0.7 liegen, deuten beim Menschen daraufhin, daß neben Lipidoxidation Ketonkörper aufgebaut werden und mit dem Harn verloren gehen (OWEN, REICHARD, PATEL und BODEN, 1979).

5.3. Vergleich von Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel in hungernden Insekten und Säugetieren

Hunger bewirkt tiefgreifende Veränderungen im Stoffwechsel von Tieren. Diese Veränderungen hängen neben dem Ausbleiben von Nährstoffen auch von den Freßgewohnheiten der Tiere ab. Während z.B. der Mensch täglich zu mehr oder weniger festgelegten Zeitpunkten Nahrung aufnimmt, fressen Ratten bei ständigem Nahrungsangebot vorwiegend nachts (STRUBBE, 1982). Auch bei Insekten existieren Unterschiede im Freßverhalten. Larven von *Manduca sexta* fressen während des gesamten Tages, also ohne Rücksicht auf die Lichtperiode, das Blattwerk von Nachtschattengewächsen (oder synthetische Diät). Die Freßtätigkeit wird jedoch durch in der Länge variable Ruhephasen unterbrochen (REINECKE, BUCKNER und GRUGEL, 1980). Adulte Tiere von *Manduca sexta* saugen vor allen Dingen während ihrer nächtlichen Aktivitätsperiode Blütensäfte auf.

Ein Tierorganismus befindet sich solange in einem "Nicht-Hunger-Zustand" wie er nach einem Mahl aus dem Darm Nährstoffe absorbieren kann. Aus diesen Substanzen wird der momentane Energiestoffwechsel gedeckt und zusätzlich Reserven in Leber, Fettgewebe, Muskeln oder ähnlichen Organen aufgebaut (postprandiale Phase). Der Organismus muß dazu übergehen, seine lebensnotwendigen Funktionen aus den angelegten Reserven zu bestreiten, wenn die Nährstoffzufuhr aus dem Darm gering wird und letztlich ausbleibt (postabsorptiver Status). Die Regulation des Stoffwechsels beim Übergang dieser Phasen steht bei Säugetieren unter strikter hormoneller Kontrolle. Insulin und Glucagon spielen z.B. bei der Glucose-Homöostase eine wichtige Rolle (BUCHANAN, 1977).

Im Labor werden Ratten normalerweise auf einer ausgewogenen Diät gehalten, wie es z.B. das Produkt Altromin C 1004 darstellt. Es enthält neben Salzen, Vitaminen etc. 60 % Stärke/Saccharose, 25 % Casein und 3 % Sojabohnenöl. Die Zusammensetzung der Diät, mit der Larven von *Manduca sexta* während der vorliegenden Untersuchung aufgezogen wurden, ist dieser recht ähnlich (s. 3.1.).

Werden Ratten *ad libitum* mit einer ausgewogenen Diät aufgezogen (s.o.),

so liegt die Blutglucosekonzentration in der Dunkelperiode, wenn die Tiere Futter aufnehmen, höher als in der Lichtperiode (TIEDGEN und SEITZ, 1980; SHIKAMA, YAJIMA und UI, 1980). Während der Futteraufnahme wird der Glykogengehalt der Leber erhöht, was mit der Aktivierung der Glykogensynthese und der Inaktivierung der Glykogenphosphorylase des Organs einhergeht (TIEDGEN und SEITZ, 1980; SHIKAMA, YAJIMA und UI, 1980). Der Glucosespiegel des Blutes ist erhöht, da die Leber nicht die gesamte aus dem Darm kommende Glucosemenge aufnehmen kann; es kommt dadurch zur Sekretion von Insulin. Deshalb folgt die Insulinkonzentration in ihrer Höhe in etwa der Blutglucosekonzentration. Insulin seinerseits führt zur Aufnahme von Glucose in das Fettgewebe und zur Bildung von alpha-Glycerophosphaten für die Veresterung von freien Fettsäuren (FFA). Gleichzeitig verhindert Insulin in dieser Phase die Abgabe von FFA an das Plasma (OWEN, REICHARD, PATEL und BODEN, 1979); auch die Glucoseaufnahme in die Muskeln wird durch Insulin erhöht. Wird eine kohlenhydratreiche und fettarme Diät verabreicht oder zu viele Substanzen aufgenommen, werden überschüssige Kohlenhydrate in Lipide umgewandelt und im Fettgewebe abgelagert. Auch in Insekten existiert dieser Stoffwechselweg, da in gefütterten, adulten Tieren von *Periplaneta americana* 7 bis 10 % der mit markierter Glucose injizierten Radioaktivität nach 3 h in der Triacylglycerinfraction wiedergefunden wurden (KALLAPUR, DOWNER und GEORGE, 1980). In Tieren, die 3 Tage hungerten, ist diese Kapazität etwa um die Hälfte reduziert.

Nehmen Ratten während der Lichtperiode keine Nahrung mehr zu sich, wie es normalerweise der Fall ist, kehren sich die oben beschriebenen Prozesse langsam um. Der Blutzuckerspiegel, der Glykogengehalt der Leber und die aktive Form der Glykogensynthese nehmen ab, dagegen steigt die aktive Form der Glykogenphosphorylase an, um Glucose dem Stoffwechsel bereitzustellen (TIEDGEN und SEITZ, 1980; SHIKAMA, YAJIMA und UI, 1980). Während der Insulinspiegel in der Aufnahmephase angestiegen war, nimmt er nun ab (TIEDGEN und SEITZ, 1980). Sowohl die Glucagonkonzentration als auch die intrazelluläre Konzentration von A-3:5-MP in der Leber bleiben überraschenderweise unverändert (TIEDGEN und

SEITZ,1980).Der Anstieg der Phosphorylaseaktivität in der Leber hungernder Ratten (SHIKAMA,YAJIMA und UI,1980) scheint jedoch nicht durch die Erhöhung der Glucagonkonzentration des Blutes,sondern durch Veränderungen des molaren Verhältnisses von Insulin zu Glucagon beeinflusst zu werden.

Hungern Ratten über den normalen Freß/Hunger-Rhythmus hinaus,so beträgt der Glykogengehalt der Leber nach 24 h etwa ein Sechstel,der des Hinterbeinmuskels etwa 50 % des Ausgangswertes (REMESAR und ALEMANY,1980).Diese Autoren berichteten auch,daß die Phosphorylaseaktivität in der gleichen Zeit von 70 auf 35 % abfällt,während die aktive Form der Glykogensynthase ansteigt.REMESAR und ALEMANY (1980) meinten,daß Glykogenprimer erhalten bleiben müssen,um bei Substratangebot sofort Glykogen synthetisieren zu können.Glykogenprimer sind notwendig,da Glucose nicht als Akzeptor für Glycosyl-Einheiten in Frage kommt (HERS,1976).

Werden Ratten für 3 Tage gehungert,geht der Glykogengehalt der Leber auf weniger als 10 % des Ausgangswertes zurück (WEIGAND,HANNAPPEL und BRAND, 1980).Die Glykogenreserven der Leber können wegen ihrer geringen Menge nur für kurze Hungerperioden eine Rolle spielen.In einem nüchternen Menschen wird die Zuckerabgabe der Leber zu etwa 80 % aus Glykogenabbau gedeckt,dagegen werden die restlichen 20 % durch Gluconeogenese bereitgestellt;nach 3 Tagen Hunger stammen 80 % aus der Gluconeogenese (OWEN,REICHARD,PATEL und BODEN,1979).In hungernden,adulten Wanderheuschrecken,*Locusta migratoria*,ist die Gluconeogeneserate erhöht,sie liegt etwa 10mal höher als in gefütterten Tieren (DAVIES und GOLDSWORTHY,1982).In Wanderheuschrecken steigt während des Hungerns die Hämolympfkonzentration der Aminosäuren an (GOLDSWORTHY,ROBINSON und MORDUE,1981);Aminosäuren stellen die Substrate für die Gluconeogenese dar.

Die Veränderungen des Blutglucosespiegels haben große Bedeutung für die weiteren physiologischen Prozesse,die in einem hungernden Säugetier ablaufen, da sie anzeigen können,daß die Substrate für die Energiegewinnung abnehmen. Möglicherweise messen sogenannte Glucostaten im Hypothalamus die Glucosekon-

zentrationen (THEWS, MUTSCHLER und VAUPEL, 1980). Das Pankreas wird dann veranlaßt, das entsprechende molare Verhältnis zwischen Insulin und Glucagon einzustellen, um den Stoffwechsel mit genügend Substraten zu versorgen. Allerdings wird die Glucosekonzentration des Blutes nicht mehr als der einzige Faktor angesehen, der zur Glucagonsekretion aus den A-Zellen des Pankreas führt (z.B. Aminosäuren und Katecholamine; BUCHANAN, 1977). Bei *Manduca sexta* wurde in hungrigen Larven kein Rückgang der Hämolymphtrehalosekonzentration gefunden. Allerdings könnte eine entsprechende Signalwirkung durch ein gemeinsames Stoffwechselprodukt von Glucose und Fructose übernommen werden. Die Versuche zu diesem Problemkreis konnten keine Klarheit verschaffen. Die Aktivierung der Fettkörperglykogenphosphorylase tritt in hungrigen Larven von *Manduca sexta* verglichen mit den Phosphorylaseaktivitäten der Rattenleber (SHIKAMA, YAJIMA und UI, 1980) schneller und kräftiger ein, was wahrscheinlich mit den unterschiedlichen Freßgewohnheiten beider Tierarten im betrachteten Zeitraum zusammenhängen dürfte. Die Aktivierung des Fettkörperenzym durch ein Hormon der Cc erfolgt bei *Manduca sexta* recht schnell (ZIEGLER, 1979); es kann deshalb angenommen werden, daß auch bei *Manduca sexta* A-3:5-MP als Second-Messenger in die Aktivierungssequenz eingeschlossen ist. Wie die Information zur Hormonausschüttung die Cc der hungrigen Larven erreicht, ist nicht bekannt. Möglicherweise spielen die Cc die Rolle des Meßfühlers selbst; sie wären in Larven für diese Aufgabe gut geeignet, da sie ständig von Hämolymphe umspült werden. Die Cc sind durch Nervenstränge mit Gehirn und Zentralnervensystem verbunden (NIJHOUT, 1975 a), sodaß die Anregung durchaus auch von dort kommen könnte.

In einem nüchternen Menschen beträgt die Konzentration der FFA am Morgen etwa 0.6 mmol/l; in dieser Situation werden etwa 50 % des Energiebedarfs aus FFA gewonnen (OWEN, REICHARD, PATEL und BODEN, 1979). Die Konzentration steigt nach 3 tägigen Hunger auf 1.6 mmol/l. Diese Beobachtung steht im Einklang mit Ergebnissen, die für Ratten gewonnen wurden, wonach der Lipidgehalt der Leber innerhalb von 3 Tagen Hunger um 25 bis 50 % abnimmt (WEIGAND, HANNAPPEL und BRAND, 1980). Insgesamt sind jedoch die größten Fettreserven im Fettgewebe der

Säuger enthalten; aus diesem Gewebe werden FFA an das Blut abgegeben und an Plasmaalbumin gebunden transportiert. Die Freisetzung der FFA steht möglicherweise unter der Kontrolle von Glucagon (wobei A-3:5-MP in den Aktivierungsprozeß einbezogen sein dürfte) und Insulin, das die Freisetzung von FFA verhindert und die Veresterung der Fettsäuren erhöht (FAIN und SHEPHERD, 1979). Die Rolle von Glucagon als lipolytisches Hormon ist noch nicht vollständig geklärt, da es zwar bei Ratten und Hühnern auf das Fettgewebe wirkt, beim Menschen Lipolyse jedoch möglicherweise nur durch pharmakologisch hohe Dosen erreicht wird (BUCHANAN, 1977).

In hungernden, adulten Wanderheuschrecken, *Locusta migratoria*, steigt die Lipidkonzentration der Hämolymphe innerhalb von 5 Tagen von 10 auf 40 mg/ml an, wobei vor allen Dingen die Konzentration der Diacylglycerine zunimmt (MWANGI und GOLDSWORTHY, 1977). Es ergeben sich Unterschiede zwischen Säugtieren und Insekten und zwischen den einzelnen Entwicklungsstadien von Insekten. Während sowohl adulte Tiere von *Manduca sexta* (ZIEGLER, unveröffentlichte Werte) als auch von *Locusta migratoria* (MWANGI und GOLDSWORTHY, 1977) in einer Hungerphase die Lipidkonzentration der Hämolymphe erhöhen, ist das in Larven von *Manduca sexta* nicht der Fall. Die Lipidaktivierung ist bei *Locusta migratoria* während des Hungerns nicht auf die Wirkung des Adipokinetischen Hormons zurückzuführen (CHEESEMAN und GOLDSWORTHY, 1979). In Insekten steigt vor allen Dingen die Diacylglycerinfraktion der Hämolymphe, während bei Säugern die Konzentration der FFA erhöht wird.

Neben Kohlenhydraten und FFA können in Säugetieren auch Ketonkörper (z.B. Acetoacetat und beta-Hydroxybutyrat) für die Energiegewinnung eine Rolle spielen. Sogar das Zentralnervensystem kann zur Energiegewinnung Ketonkörper heranziehen (OWEN, REICHARD, PATEL und BODEN, 1979). An Insekten sind Untersuchungen zu diesem Problemkreis noch nicht durchgeführt worden.

Der Kohlenhydratstoffwechsel erscheint also sowohl bei Säugern als auch bei Insekten bei Einwirkung von Hunger schnellen Veränderungen zu unterliegen, wobei Glykogenabbau und Gluconeogenese auftreten. Wenn die Hungersituation länger

gere Zeit anhält, wird dafür gesorgt, daß in Leber bzw. Fettkörper nicht das gesamte Glykogen abgebaut wird, um bei Substratangebot die Glykogensynthese sofort wieder anlaufen zu lassen. Während längerer Hungerperioden oxidieren Säugetiere FFA, dagegen beginnen adulte Insekten wohl relativ bald Diacylglycerine zu verbrauchen, während Larven des 5. Stadiums von *Manduca sexta* möglicherweise ihre Fettreserven für die folgende Adultentwicklung und Adultzeit schonen. Die Hungerperiode von 36 h war vielleicht bei Larven von *Manduca sexta* zu kurz, um den Lipidstoffwechsel beeinflussen zu können. Bei Säugern wird die Lipidaktivierung möglicherweise durch Glucagon initiiert, doch spielt auch Insulin eine Rolle. In adulten Wanderheuschrecken wird die Lipidfreisetzung aus dem Fettkörper hungernder Tiere anscheinend nicht durch das Adipokinetische Hormon gesteuert.

6. Zusammenfassung

1. Während der späten Larvalentwicklung von *Manduca sexta* wird die Fettkörperglykogenphosphorylase zweimal recht kräftig aktiviert. Diese Aktivierungen fallen mit der letzten Larvalhäutung (Hunger und Chitinsynthese) und der Wanderphase (Hunger, körperliche Aktivität und Chitinsynthese) zusammen. Während der Freßphase des 5. Larvenstadiums und der Pharatpuppen- und Puppenzeit ist das Enzym weitgehend inaktiviert.
2. Während der Freßphase des 5. Larvenstadiums nimmt der Glykogengehalt des Fettkörpers stark zu. Während der Häutung vom 4. zum 5. Stadium und während der Wanderphase, wenn also die Phosphorylase aktiviert ist, nimmt der Glykogengehalt ab.
3. Das nichtreduzierende Disaccharid Trehalose stellt meist mit über 90 % den überwiegenden Teil der Hämolymphezucker. Während der beiden Phosphorylaseaktivierungen sind die Trehalosekonzentrationen signifikant erniedrigt. Die Glucosekonzentration der Hämolymphe ist während der Freßphase höher als während der letzten Larvalhäutung und der Pharatpuppenzeit.
4. Im Laufe der letzten Larvalhäutung nimmt die Chitinmenge bei *Manduca sexta* weiter zu, obwohl die Tiere in dieser Zeit keine Nahrung aufnehmen können. Einer der Gründe für die Phosphorylaseaktivierung in diesem Entwicklungsabschnitt könnte die Notwendigkeit sein, die Chitinsynthese aufrechtzuerhalten. Der Chitingehalt der Tiere steigt während der Freßphase des 5. Larvenstadiums um mehr als das 10fache an und geht erst in den letzten 36 h vor der Puppenhäutung auf den Ausgangswert zu Beginn des 5. Stadiums zurück.

5. Die Lipidkonzentration der Hämolymphe ist während der Freßphase des letzten Larvenstadiums mit Werten von 2 mg/ml recht niedrig. In der Pharatpuppen- und Puppenzeit liegt sie um den Faktor 3 oder 4 höher. Der Lipidstoffwechsel scheint während des betrachteten Zeitraums ausschließlich auf die Erhöhung der Reserven ausgerichtet zu sein.
In hungernden Larven verändert sich während der ersten 24 h weder die Hämolymphlipidkonzentration noch der Lipidgehalt des Fettkörpers. Die während der zweiten 24 h der Hungerperiode gefundenen Veränderungen im Lipidstoffwechsel sind wahrscheinlich nicht auf die Einwirkung von Hunger zurückzuführen, sondern treten entwicklungsbedingt auf.
6. Die Aktivierung der Fettkörperglykogenphosphorylase in hungernden Larven von *Manduca sexta* hängt nicht von der Dehnung des Darmes und damit nicht von einer Erregung von Streckrezeptoren ab. Auch die bei hungernden Tieren auftretende körperliche Aktivität führt nicht zu einer Aktivierung des Enzyms, sodaß das Ausbleiben von Nährstoffen dafür verantwortlich sein dürfte. Durch die erhöhte Phosphorylaseaktivität werden dem Stoffwechsel Glucosemoleküle zugeführt.
7. Die Aktivierung der Fettkörperglykogenphosphorylase in hungernden Larven von *Manduca sexta* wird durch ein Peptid der Corpora cardiaca hervorgerufen. Eine physiologische Rolle für eine Substanz, die den Kohlenhydratstoffwechsel von Insekten beeinflusst, wurde somit beschrieben. Das Peptid wird als "Glykogenphosphorylase aktivierendes Hormon" (GPAH) bezeichnet.
8. Die Trehalosekonzentration der hungernden Larven liegt meist, wenn auch nicht statistisch signifikant, höher als in den gefütterten Kontrolltieren. Die Glucosekonzentration der Hämolymphe sinkt recht schnell ab. Ein Stoffwechselprodukt der Glucose könnte an der Regulation der Ausschüt-

tung des Glykogenphosphorylase aktivierenden Hormons beteiligt sein.

9. Die während der Hungerperiode aus dem Glykogen abgebauten Glucosemoleküle werden teilweise durch die Chitinsynthese in der Epidermis verbraucht; sie werden jedoch auch für die Energiegewinnung herangezogen und veratmet.
10. Die Respiratorischen Quotienten während des 5. Larvenstadiums und des Hungerns von *Manduca sexta* zeigen an, daß meist Lipide und Kohlenhydrate zusammen oxidiert werden. Kohlenhydrate allein werden wohl nur zeitweise in der Puppenzeit veratmet.

7. Literaturverzeichnis

- BADE, M.L. (1975) : Time pattern of appearance and disappearance of active molting chitinase in *Manduca* cuticle. The endogenous activity. FEBS Letters 51 , 161 - 163
- BADE, M.L. und WYATT, G.R. (1962) : Metabolic conversions during pupation of the cecropia silkworm. I. Deposition and utilization of nutrient reserves. Biochem. J. 83 , 470 - 478
- BEENAKKERS, A.M.Th. (1969) : The influence of corpus allatum and cardiacum on lipid metabolism in *Locusta*. Gen. Comp. Endocrinol. 13 , 492
- BEENAKKERS, A.M.Th., VAN DER HORST, D.J. und VAN MARREWIJK, W.J.A. (1981) : Role of lipids in energy metabolism. In : Energy metabolism in insects. Ed. : Downer, R.G.H., pp. 53 - 100 , Plenum Press, New York
- BHASKARAN, G. und JONES, G. (1980) : Neuroendocrine regulation of corpus allatum activity in *Manduca sexta* : The endocrine basis for starvation-induced supernumerary larval moult. J. Insect Physiol. 26 , 431 - 440
- BOLLENBACHER, W.E., SMITH, S.L., GOODMAN, W. und GILBERT, L.I. (1981) : Ecdysteroid titer during larval-pupal-adult development of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Gen. Comp. Endocrinol. 44 , 302 - 306
- BOLLENBACHER, W.E., VEDECKIS, W.V., GILBERT, L.I. und O'CONNOR, J.D. (1975) : Ecdysone titers and prothoracic gland activity during the larval-pupal development of *Manduca sexta*. Develop. Biol. 44 , 46 - 53

- BRADFIELD IV, J.Y. und DENLINGER, D.L. (1980) : Diapause development in the tobacco hornworm : A role for ecdysone or juvenile hormone ?
Gen. Comp. Endocrinol. 41 , 101 - 107
- BUCHANAN, K.D. (1977) : Glucagon. In : Insulin and metabolism. Ed.: Bajaj, J.S., pp. 233 - 270 , Elsevier/North-Holland , Biomedical Press
- BUCK, J.B. (1953) : Physical properties and chemical composition of insect blood. In : Insect physiology. Ed. : Roeder, K.D. , pp. 147 - 190
John Wiley , New York
- BURTON, K. (1956) : A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of desoxyribonucleic acid. Biochem. J. 62 , 315 - 323
- CALVEZ, B. und FOURCHE, J. (1980) : Protein synthesis in the fat body of the fifth larval instar *Philosamia cynthia* larvae - Relation to two feeding periods. Develop., Growth and Differ. 22 , 93 - 102
- CHANG, F. und FRIEDMAN, S. (1971) : A developmental analysis of the uptake and release of lipids by the fat body of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Insect Biochem. 1 , 63 - 80
- CHEESEMAN, P. und GOLDSWORTHY, G.J. (1979) : The release of adipokinetic hormone during flight and starvation in *Locusta*. Gen. Comp. Endocrinol. 37 , 35 - 43
- CHILDRESS, C.C. und SACKTOR, B. (1970) : Regulation of glycogen metabolism in insect flight muscle. Purification and properties of phosphorylases *in vitro* and *in vivo*. J. Biol. Chem. 245 , 2927 - 2936

- CHINO, H. und GILBERT, L.I. (1965) : Lipid release and transport in insects.
Biochem. Biophys. Acta 98 , 94 - 110
- CHIPPENDALE, G.M. (1978) : The functions of carbohydrates in insect life processes. In : Biochemistry of insects. Ed. : Rockstein, M. pp. 2 - 55 , Academic Press , New York
- DAHLMAN, D.L. (1973) : Starvation of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*.
1. Changes in hemolymph characteristics of 5th-stage larvae.
Ann. Ent. Soc. Am. 66 , 1023 - 1029
- DAHLMAN, D.L. (1975) : Trehalose and glucose levels in hemolymph of diet-reared, tobacco leaf-reared and parasitized tobacco hornworm larvae.
Comp. Biochem. Physiol. 50 A , 165 - 167
- DAVIES, H.C. und GOLDSWORTHY, G.J. (1982) : Studies on the control of gluconeogenesis in *Locusta migratoria*. Gen. Comp. Endocrinol. 46 , 382
- DOWNER, R.G.H. (1978) : Functional role of lipids in insects. In : Biochemistry of insects. Ed. : Rockstein, M. , pp. 57 - 92 , Academic Press , New York
- FAIN, J.N. und SHEPHERD, R.E. (1979) : Hormonal regulation of lipolysis : Role of cyclic nucleotides, adenosine, and free fatty acids. In : Advances in experimental medicine and biology. Hormones and energy metabolism. Eds. : Klachko, D.M., Anderson, R.R. und Heimberg, M. , pp. 43 - 77 , Plenum Press , New York
- GILES, K.W. und MYERS, A. (1965) : An improved diphenylamine method for the estimation of deoxyribonucleic acid. Nature (London) 206 , 93

- GOLDSWORTHY, G.J., ROBINSON, J. und MORDUE, W. (1981) : Endocrinology .
Blackie , Glasgow
- GOODMAN, W. und GILBERT, L.I. (1978) : The hemolymph titer of juvenile hormone binding protein and binding sites during the fourth larval instar of *Manduca sexta*. Gen. Comp. Endocrinol. 35 , 27 - 34
- GROWE, H. (1980) : Wirkung des Hyperglykämischen Faktors auf den Kohlenhydratstoffwechsel von *Manduca sexta*-Larven (Lepidoptera : Sphingidae).
Diplomarbeit. Freie Universität Berlin
- HERS, H.G. (1976) : The control of glycogen metabolism in the liver. Ann. Rev. Biochem. 45 , 167 - 189
- HETTICK, B.P. und BADE, M.L. (1979) : *In vitro* chitin biosynthesis by cuticular disks of *Manduca sexta* larvae in the V instar. In : Proc. 1st Intern. Conf. Chitin/Chitosan. Eds. Muzzarelli, R.A. und Pariser, E.R. , pp. 464 - 471
- HOFFMAN, J.D., LAWSON, F.R. und YAMAMOTO, R.T. (1966) : Tobacco hornworms. In : Insect colonization and mass production. Ed.: Smith, C.N. , pp. 479 - 486 , Academic Press , New York
- JUNGREIS, A.M. (1978) : The composition of larval-pupal moulting fluid in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. J. Insect Physiol. 24 , 65 - 73
- JUNGREIS, A.M., JATLOW, P. und WYATT, G.R. (1973) : Inorganic ion composition of haemolymph of the Cecropia silkworm : Changes with diet and ontogeny. J. Insect Physiol. 19 , 225 - 233

- JUNGREIS, A.M. und WYATT, G.R. (1972) : Sugar release and penetration in insect fat body : Relations to regulation of hemolymph trehalose in developing stages of *Hyalophora cecropia*. Biol. Bull. 143 , 367 - 391
- KALLAPUR, V.L., DOWNER, R.G.H. und GEORGE, J.C. (1980) : Conversion of (U-¹⁴C)glucose to lipid in the American cockroach, *Periplaneta americana* L. Arch. Intern. Physiol. Biochim. 88 , 363 - 369
- KILBY, B.A. (1963) : The biochemistry of the insect fat body. Adv. Insect Physiol. 1 , 111 - 174
- KIMURA, S. (1973) : The control of chitinase activity by ecdysterone in larvae of *Bombyx mori*. J. Insect Physiol. 19 , 115 - 123
- KRAMER, S.J., MUNDALL, E.C. und LAW, J.H. (1980) : Purification and properties of manducin, an amino acid storage protein of the haemolymph of larval and pupal *Manduca sexta*. Insect Biochem. 10 , 279 - 288
- KRISHNAKUMARAN, A., BERRY, S.J., OBERLANDER, H. und SCHNEIDERMAN, H.A. (1967) : Nucleic acid synthesis during insect development - II. Control of DNA synthesis in the Cecropia silkworm and other Saturniid moths. J. Insect Physiol. 13 , 1 - 57
- LAYNE, E. (1957) : Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. In : Methods in enzymology , Vol. 3. Eds. : Colowick, S.P. und Kaplan, N.O. , pp. 447 - 454 , Academic Press , New York
- LINZEN, B. und WYATT, G.R. (1964) : The nucleic acid content of tissues of Cecropia silkworm pupae - Relations to body size and development. Biochem. Biophys. Acta 87 , 188 - 198

- LOCKE, M. (1970) : The molt/intermolt cycle in the epidermis and other tissues of an insect *Calpododes ethlius* (Lepidoptera : Hesperidae). Tissue & Cell 2 , 197 - 223
- MAYER, R.J. und CANDY, R.J. (1969) : Control of haemolymph lipid concentration during flight : An adipokinetic hormone from the corpora cardiaca. J. Insect Physiol. 15 , 611 - 620
- MIGLIORI NATALIZI, G. und FRONTALI, N. (1966) : Purification of insect hyperglycaemic and heart accelerating hormones. J. Insect Physiol. 12 , 1279 - 1287
- MIGLIORI NATALIZI, G., PANSA, M.C., D'AJELLO, V., CASAGLIA, O., BETTINI, S. und FRONTALI, N. (1970) : Physiologically active factors from the corpora cardiaca of *Periplaneta americana*. J. Insect Physiol. 16 , 1827 - 1836
- MOKRASH, L. (1954) : Analysis of hexose phosphates and sugar mixtures with the anthrone reagent. J. Biol. Chem. 208 , 55 - 59
- MWANGI, R.W. und GOLDSWORTHY, G.J. (1977) : Interrelationships between haemolymph lipid and carbohydrate during starvation in *Locusta*. J. Insect Physiol. 23 , 1275 - 1280
- NIJHOUT, H.F. (1975 a) : Axonal pathways in the brain-retrocerebral neuroendocrine complex of *Manduca sexta* (L.) (Lepidoptera : Sphingidae). Int. J. Insect Morphol. & Embryol. 4 , 529 - 538
- NIJHOUT, H.F. (1975 b) : Dynamics of juvenile hormone action in larvae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.). Biol. Bull. 149 , 568 - 579

- NIJHOUT, H.F. (1976) : The rôle of ecdysone in pupation of *Manduca sexta*.
J. Insect Physiol. 22 , 453 - 463
- NIJHOUT, H.F. und WILLIAMS, C.M. (1974) : Control of moulting and metamorphosis
in the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.) : Cessation of juvenile
hormone secretion as a trigger for pupation. J. Exp. Biol. 61 ,
493 - 501
- ORCHARD, I. und LOUGHTON, B.G. (1981) : The neural control of release of hyper-
lipaemic hormone from the corpus cardiacum of *Locusta migratoria*.
Comp. Biochem. Physiol. 68 A , 25 - 30
- OWEN, O.E., REICHARD, G.A., PATEL, M.S. und BODEN, G. (1979) : Energy metabolism
in feasting and fasting. In : Advances in experimental medicine
and biology. Hormones and energy metabolism. Eds. : Klachko, D.M.,
Anderson, R.R. und Heimberg, M. , pp. 169 - 188 , Plenum Press ,
New York
- PANT, R. und KUMAR, S. (1979) : Metabolic fate of carbohydrates and lipids
during moulting cycle of *Philosamia ricini* (Lepidoptera : Satur-
niidae). Insect Biochem. 9 , 577 - 582
- PRESCOTT, D.J., HILDEBRAND, J.G., SANES, J.R. und JEWETT, S. (1977) : Biochemical
and developmental studies of acetylcholine metabolism in the cen-
tral nervous system of the moth *Manduca sexta*. Comp. Biochem.
Physiol. 56 C , 77 - 84
- REMESAR, X. und ALEMANY, M. (1980) : Changes-induced in liver and muscle gly-
cogen enzymes by 24-hour fasting in the rat. Horm. Metab. Res. 12 ,
19 - 22

- REINECKE, J.P., BUCKNER, J.S. und GRUGEL, S.R. (1980) : Life cycle of laboratory-reared tobacco hornworms, *Manduca sexta*, a study of development and behavior, using time-lapse cinematography. Biol. Bull. 158 , 129 - 140
- RIDDIFORD, L.M. (1978) : Ecdysone-induced change in cellular commitment of the epidermis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, at the initiation of metamorphosis. Gen. Comp. Endocrinol. 34 , 438 - 446
- RIDDIFORD, L.M. (1981) : Hormonal control of epidermal cell development. Amer. Zool. 21 , 751 - 762
- RIDDIFORD, L.M. und CURTIS, A.T. (1978) : Hormonal control of epidermal detachment during the final feeding stage of the tobacco hornworm larva. J. Insect Physiol. 24 , 561 - 568
- ROBINSON, N.L. und GOLDSWORTHY, G.J. (1974) : The effect of locust adipokinetic hormone on flight muscle metabolism *in vivo* and *in vitro*. J. Comp. Physiol. 89 , 369 - 377
- ROBINSON, N.L. und GOLDSWORTHY, G.J. (1977) : Adipokinetic hormone and the regulation of carbohydrate and lipid metabolism in a working flight muscle preparation. J. Insect Physiol. 23 , 9 - 16
- ROHDE, M., SIEGERT, K. und ZIEGLER, R. (1982) : Changes in the neuroendocrine system during the late larval development of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Gen. Comp. Endocrinol. 46 , 381
- RUSSEK, M., LORA-VILCHIS, M.C. und ISLAS-CHAIRES, M. (1980) : Food intake inhibition elicited by intraportal glucose and adrenaline in dogs on a 22 hour-fasting/2 hour feeding schedule. Physiol. & Behav. 24, 157-161

- SAITO,S. (1963) : Trehalose in the body fluid of the silkworm,*Bombyx mori*.
J. Insect Physiol. 9 , 509 - 519
- SCHMIDT,F.H. (1961) : Die enzymatische Bestimmung von Glucose und Fructose
nebeneinander. Klin. Wschr. 39 , 1244 - 1247
- SCHNEIDERMAN,H.A. und WILLIAMS,C.M. (1953) : The physiology of insect dia-
pause. VII. The respiratory metabolism of the Cecropia silkworm
during diapause and development. Biol. Bull. 105 , 320 - 334
- SEHNAL,F. und SLAMA,K. (1966) : The effect of corpus allatum hormone on respi-
ratory metabolism during larval development and metamorphosis of
Galleria mellonella L. J. Insect Physiol. 12 , 1333 - 1342
- SHIKAMA,H.,YAJIMA,M. und UI,M. (1980) : Glycogen metabolism in rat liver
during transition from the fed to fasted states. Biochim. Biophys.
Acta 631 , 278 - 288
- SIEGERT,K. (1980) : Veränderungen des Kohlenhydratstoffwechsels während der
späten Pharatadulentwicklung und des Adultlebens von *Manduca sexta*
(Lepidoptera : Sphingidae). Diplomarbeit.Freie Universität Berlin.
- SIEGERT,K. und ZIEGLER,R. (1981) : Regulation of carbohydrate and lipid meta-
bolism during pupal diapause of *Manduca sexta* (Lepidoptera : Sphin-
gidae). Verh. Dtsch. Zool. Ges. 1981 , 273
- SIEGERT,K. und ZIEGLER,R. (1982) : Oxygen consumption and respiratory quo-
tients in *Manduca sexta* (Lepidoptera : Sphingidae). Verh. Dtsch.
Zool. Ges. 1982 , 332

- STEELE, J.E. (1961) : Occurrence of a hyperglycaemic factor in the corpus cardiacum of an insect. *Nature* 192 , 680 - 681
- STEELE, J.E. (1963) : The site of action of insect hyperglycaemic hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 3 , 46 - 52
- STEELE, J.E. (1976) : Hormonal control of metabolism in insects. *Adv. Insect Physiol.* 12 , 239 - 323
- STEELE, J.E. (1981) : The role of carbohydrate metabolism in physiological function. In : *Energy metabolism in insects*. Ed. : Downer, R.G.H. , pp. 101 - 133 , Plenum Press , New York
- STEWART, P.A., BAUMHOVER, A.H., BENNETT, L.S. und HOBGOOD jr., J.M. (1970) : A method of sexing larvae of tobacco and tomato hornworms. *J. Econ. Entomol.* 67 , 994 - 995
- STONE, J.V. und MORDUE, W. (1980) : Adipokinetic hormone. In : *Neurohormonal techniques in insects*. Ed. : Miller, T.A. , pp. 31 - 80 , Springer-Verlag , Berlin
- STONE, J.V., MORDUE, W., BATLEY, K.E. und MORRIS, H.R. (1976) : Structure of locust adipokinetic hormone, a neurohormone that regulates lipid utilization during flight. *Nature* 263 , 207 - 211
- STRANG, J.H. und CLEMENT, E.M. (1980) : The relative importance of glucose and trehalose in the nutrition of the nervous system of the locust *Schistocerca gregaria americana*. *Insect Biochem.* 10 , 155 - 161
- STRUBBE, J.H. (1982) : Food intake regulation in the rat. *Proceedings of the*

- 3rd Congress of the European Society for Comparative Physiology and Biochemistry , Vol. 1. Eds. : Addink,A.D.F. und Spronk,N. , pp. 31 39 , Pergamon Press , Oxford
- THEWS,G.,MUTSCHLER,E. und VAUPEL,P. (1980) : Anatomie,Physiologie,Pathophysiologie des Menschen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH , Stuttgart
- TIEDGEN,M. und SEITZ,H.J. (1980) : Dietary control of circadian variations in serum insulin,glucagon and hepatic cyclic AMP. J. Nutr. 110 , 876 - 882
- TREHERNE,J.E. (1960) : The nutrition of the central nervous system in the cockroach,*Periplaneta americana* L. The exchange and metabolism of sugars. J. Exp. Biol. 37 , 513 - 533
- TRUMAN,J.W. (1972) : Physiology of insect rhythms. I. Circadian organization of the endocrine events underlying the moulting cycle of the tobacco hornworms. J. Exp. Biol. 57 , 805 - 820
- WEIGAND,W.,HANNAPPEL,E. und BRAND,K. (1980) : Effect of starvation and re-feeding a high-protein or high-carbohydrate diet on lipid composition and glycogen content of rat livers in relation to age. J. Nutr. 110 , 669 - 674
- WIELGUS,J.J.,BOLLENBACHER,W.E. und GILBERT,L.I. (1979) : Correlations between epidermal DNA synthesis and haemolymph ecdysteroid titre during the last larval instar of the tobacco hornworm,*Manduca sexta*. J. Insect Physiol. 25 , 9 - 19

- WIELGUS, J.J. und GILBERT, L.I. (1978) : Epidermal cell development and control of cuticle deposition during the last larval instar of *Manduca sexta*. J. Insect Physiol. 24 , 629 - 637
- WILLIAMS, C.M. (1968) : Tetrodotoxin : A nonlethal paralytic for insects. Science 160 , 444
- WILLIAMS-BOYCE, P.K. und JUNGREIS, A.M. (1980) : The larval-pupal transformation of *Manduca sexta* : Changes in body and tissue weights and amount of hemolymph contaminating the tissues. Ann. Ent. Soc. Am. 73 , 602 - 608
- WLODAWER, P. und WISNIEWSKA, A. (1965) : Lipids in the haemolymph of waxmoth larvae during starvation. J. Insect Physiol. 11 , 11 - 20
- WYATT, G.R. (1967) : The biochemistry of sugars and polysaccharides in insects. Adv. Insect Physiol. 4 , 287 - 360
- WYATT, G.R. (1975) : Regulation of protein and carbohydrate metabolism in insect fat body. Verh. Dtsch. Zool. Ges. 1974 , 209 - 226
- WYATT, G.R. (1980) : The fat body as a protein factory. In : Insect biology in the future. Eds. : Locke, M. und Smith, D.S. , pp. 201 - 226 , Academic Press , New York
- ZALUSKA, H. (1959) : Glycogen and chitin metabolism during development of the silkworm (*Bombyx mori* L.). Acta Biol. Exp. 19 , 339 - 351
- ZIEGLER, R. (1979) : Hyperglycaemic factor from the corpora cardiaca of *Manduca sexta* (L.) (Lepidoptera: Sphingidae). Gen. Comp. Endocrinol. 39, 350-357

ZIEGLER, R. (1980) : Hypertrehalokämische und adipokinetische Aktivität bei *Manduca sexta*. Verh. Dtsch. Zool. Ges. 1980 , 308

ZIEGLER, R. und SCHULZ, M. (1982) : Hormonal regulation of lipid mobilization in the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (Lepidoptera : Sphingidae) Acta Endocrinol., Suppl. 246 , 32 - 33

ZÖLLNER, N. und KIRSCH, K. (1962) : Über die quantitative Bestimmung von Lipoiden (Mikromethode) mittels der vielen natürlichen Lipoiden (allen bekannten Plasmalipoiden) gemeinsamen Sulphophosphovanillin-Reaktion. Z. ges. exp. Med. 135 , 545 - 561

8. Danksagung

Die vorliegende Untersuchung entstand auf Anregung von Prof. Dr. R. Ziegler. Für seine Unterstützung möchte ich mich an dieser Stelle bedanken.

Mein Dank gilt aber auch allen Mitarbeitern des Instituts für Tierphysiologie und Angewandte Zoologie und den Mitgliedern der AG Stoffwechselphysiologie I, die zur Fertigstellung der vorliegenden Untersuchung beitrugen, besonders Herrn Dr. Hanns-Joachim Weinmann (jetzt Schering AG Berlin), der während seiner Zugehörigkeit zum Institut ein ständiger und zuverlässiger Ansprechpartner war, sowie Fr. Hannelore Carow und Fr. Marion Rohde, die mich bei der Untersuchung der späten Larvalentwicklung von *Manduca sexta* tatkräftig unterstützten. Den Tierpflegern Fr. M. Rohde, Fr. R. Schädler, Fr. M. Schulz, Fr. A. Reutzel, Hr. T. Bigalke und Hr. T. Rohloff sei für ihre zuverlässige Arbeit gedankt.

Das Direktorium der WE 5 stellte mir einen Arbeitsplatz zur Verfügung. Prof. Dr. W. Knülle und Dr. D. Rudolf (Arbeitsgruppe 'Angewandte Zoologie') überließen mir dankenswerterweise für einige Versuche Klimakammern.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) sei für die gewährte finanzielle Unterstützung gedankt.

9. Lebenslauf

- 15.6.1951 als Sohn von Karl Siegert (geb. 7.7.1915, gest. 4.2.1973) und Ursula Siegert (geb. Jung, 27.5.1924) in Berlin-Neukölln geboren
- 1958 - 1961 Besuch der Herrmann-Boddin-Schule
- 1961 - 1964 Besuch der Eduard-Möricke-Schule
- 1964 - 1971 Besuch der Ernst-Abbe-Oberschule (Gymnasium)
- 14.1.1971 Abitur
- SS 1971 Beginn des Biologiestudiums an der Freien Universität Berlin
- 12.7.1974 Vordiplom mit der Gesamtnote "gut"
- WS 1975 - SS 1978 Studentischer Tutor am Institut für Tierphysiologie und Angewandte Zoologie
- SS 1978 Studentischer Tutor im Praktikum "Biologie für Mediziner" Teil Evolution
- 1979 Diplomarbeit mit dem Titel "Veränderungen des Kohlenhydratstoffwechsels während der späten Pharateadultentwicklung und des Adultlebens von *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae)" unter Anleitung von Priv.-Doz. Dr. R. Ziegler am Institut für Tierphysiologie und Angewandte Zoologie der Freien Universität Berlin
- 26.2.1980 Diplomprüfung mit der Gesamtnote "sehr gut"
- 1.3.1980 - 28.2.1982 Wissenschaftlicher Mitarbeiter von Prof. Dr. R. Ziegler (aus Mitteln der DFG) und Doktorarbeit mit dem Titel "Regulation des Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsels während der späten Larvalentwicklung und des Hungerns von *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae)"

